

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
OUASSILA GAOUAR

ÉTUDE DU RÔLE DE L'EFFECTEUR CANDIDAT 124202 DE *MELAMPSORA*
LARICI-POPULINA DANS L'INTERACTION PLANTE-PATHOGENE

AOÛT 2014

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Monsieur le Professeur Hugo Germain, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, à l'Université du Québec à Trois-Rivières. Je le remercie tout particulièrement de la confiance qu'il m'a témoignée en m'encourageant à formuler mes propres hypothèses et en me donnant la latitude nécessaire pour les expérimenter. Je le remercie également d'avoir toujours su se rendre disponible pour répondre à mes (listes de) questions et discuter de mes travaux.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur de recherche, Monsieur le Professeur Armand Séguin, de l'Université Laval, sans la générosité duquel je n'aurais pu me consacrer entièrement à ma formation.

Merci enfin à Messieurs les Professeurs Marc Beauregard et Lionel Berthoux, de l'Université du Québec à Trois-Rivières, d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés ici ont été réalisés au laboratoire de recherche « Immunité végétale : génomique fonctionnelle des pathosystèmes », dirigé par le Professeur Hugo Germain, à l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Parce qu'ils sont capables d'évoluer pour déjouer les défenses de leurs hôtes, les phytopathogènes font peser une menace permanente sur des cultures essentielles pour l'homme. Pour protéger les plantes contre les maladies, il importe donc de bien connaître les mécanismes infectieux déployés par les phytopathogènes.

C'est pour contribuer à cette connaissance que nous avons choisi d'étudier la fonction d'une protéine de champignon parasite, la protéine 124202, et que nous avons souhaité diffuser nos résultats sous la forme d'un article scientifique.

Le manuscrit de cet article (soumis pour publication) est inséré dans le présent mémoire. Il s'intitule : « The 124202 candidate effector of *Melampsora larici-populina* interacts with membranes ».

RÉSUMÉ

Melampsora larici-populina (*Mlp*) est un champignon microscopique agent d'une maladie de rouille foliaire qui affecte les peupliers à travers l'hémisphère Nord et compromet l'exploitation commerciale de ces arbres. *Mlp* infecte les cellules végétales via une interface membrane plasmique fongique-membrane plasmique végétale à travers laquelle il injecte des protéines spécifiques, les effecteurs, qui interfèrent dans le fonctionnement des cellules hôtes. L'effecteur présumé 124202 a été identifié lors d'une analyse *in silico* du sécrétome de *Mlp*. Il présente 30 % d'identité de séquence avec AvrM, un effecteur de l'espèce *M. lini*, ce qui suggère que ces deux protéines pourraient accomplir une fonction conservée chez le genre *Melampsora*. Nous avons entrepris d'étudier le rôle biologique de 124202. Pour des raisons pratiques, le pathosystème modèle *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* a été choisi pour représenter le pathosystème naturel peuplier-*Mlp*. Pour exprimer 124202 dans les plantes, nous avons utilisé une construction codant la protéine fluorescente verte, eGFP, fusionnée à l'extrémité N-terminale de la protéine 124202 (elle-même dépourvue de son peptide signal). À des fins de vérification, cette construction, désignée eGFP-124202 Δ SP, a d'abord été exprimée transitoirement dans *Nicotiana benthamiana* (une variété de tabac). Par la suite, des plants d'*A. thaliana* transgéniques (génotype Landsberg *erecta*, *Ler*) exprimant constitutivement eGFP-124202 Δ SP ont été générés. Comparées à des homologues non transgéniques, ces plantes ne manifestent aucun symptôme de maladie et ne présentent pas de phénotype particulier. L'observation au microscope à fluorescence semble indiquer que, dans la cellule végétale, 124202 a la membrane plasmique pour localisation principale. Cette observation, combinée aux résultats de tests de double-hybride en levure obtenus préalablement à nos travaux, suggère que 124202 pourrait interagir avec une protéine végétale ayant un domaine C2 de liaison aux ions calcium et aux lipides. En vue d'utiliser *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) pour transférer l'effecteur d'intérêt dans les cellules végétales, nous avons tenté d'exprimer, dans cette bactérie, une protéine chimérique associant un peptide de translocation bactérien et l'effecteur fongique 124202. Toutefois, seule une protéine tronquée, vraisemblablement dépourvue de la séquence de translocation, a pu être détectée. Par ailleurs, des tests de croissance bactérienne dans *A. thaliana* ont révélé que l'expression *in situ* de 124202 n'influence pas la réponse des plantes à l'infection par *Pst* DC3000. Ceci suggère que 124202 n'aurait pas d'effet suppresseur sur l'immunité végétale. Des travaux supplémentaires sont toutefois requis pour identifier la fonction biologique de cet effecteur présumé.

Mots-clés : *Melampsora larici-populina*, effecteur, 124202, AvrM, *Arabidopsis thaliana*, membrane plasmique.

ABSTRACT

Melampsora larici-populina (*Mlp*) is a microscopic fungus causing poplar leaf rust, a disease that threatens commercial poplar plantations across the northern hemisphere. The pathogenesis of poplar leaf rust involves the formation of a fungal plasma membrane-plant plasma membrane interface across which *Mlp* delivers specialized proteins, called effectors, that interfere with host cell functions. The 124202 candidate effector was identified through an *in silico* analysis of *Mlp*'s secretome. It shares 30% sequence identity with AvrM, an effector from the *M. lini* species, which suggests that both these proteins could fulfil a conserved function in the *Melampsora* genus. We set out to study the biological role of 124202. For the sake of practicality, the *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pathosystem was used as a model to investigate the plant cell-fungal effector interaction. For the expression of 124202 in plants, we used a construct encoding the eGFP green fluorescent protein, fused to the N-terminus of the 124202 protein lacking its signal peptide. This construct, designated eGFP-124202 Δ SP, was first tested in transient expression assays in *Nicotiana benthamiana* (a relative of tobacco). Transgenic *A. thaliana* plants (genotype Landsberg *erecta*, *Ler*) constitutively expressing eGFP-124202 Δ SP were then generated. Those plants showed no disease symptoms and had a phenotype similar to that of their non transgenic counterparts. Fluorescence microscopy imaging seems to indicate that 124202 localizes primarily to the plasma membrane of plant cells. This finding, together with the results of yeast double-hybrid screens conducted prior to this work, suggests that 124202 could interact with a plant protein having a C2 calcium ions and lipid binding domain. To determine whether *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) could be used to produce and transfer the effector of interest into plant cells, we tested the ability of this strain to express a chimeric protein combining a bacterial translocation peptide and the 124202 fungal effector. However, only a truncated protein, probably lacking the translocation sequence, was detected. Bacterial growth assays in *A. thaliana* revealed that *in situ* expression of 124202 did not alter the plant's response to *Pst* DC3000 infection. This suggests that 124202 does not act as a suppressor of immunity in plants. Further studies are however needed to elucidate the biological function of this candidate effector.

Keywords: *Melampsora larici-populina*, effector, 124202, AvrM, *Arabidopsis thaliana*, plasma membrane.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II	
MÉTHODOLOGIE	14
CHAPITRE III	
L'EFFECTEUR CANDIDAT 124202 DE <i>MELAMPSORA LARICI-POPULINA</i> INTERAGIT AVEC LES MEMBRANES	21
3.1 Contribution des auteurs.....	21
3.2 Résumé en français	21
3.3 Article scientifique.....	23
Abstract.....	24
Introduction.....	24
Results	26
Sequence relationships among the 12420x and AvrM proteins	26
Identification of potential 124202-interacting proteins	27
Transient expression of recombinant 124202 in <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
Analysis of <i>Arabidopsis</i> transformants.....	30
Subcellular localization of 124202 in <i>Arabidopsis</i>	31
<i>Pst</i> DC3000 infection of <i>A. thaliana</i>	33
Discussion.....	35
Conclusion	38

Materials and Methods	38
Plant material and growth conditions	38
Generation of <i>Arabidopsis</i> T-DNA insertion mutants	39
Transient expression in <i>N. benthamiana</i>	39
Plant genotyping	40
Protein extraction and immunoblot assay	40
Recombinant <i>Pseudomonas syringae</i> strain for the delivery of the 124202 effector into plant cells	41
Growth of <i>Pst</i> DC3000 <i>in vitro</i>	41
Bacterial inoculation assay	42
Yeast two-hybrid assay	42
Laser scanning confocal microscopy	43
Bioinformatic analyses	43
Phylogenetic tree reconstruction.....	43
Supplementary information	44
Acknowledgments	45
References.....	46
CHAPITRE IV	
CONCLUSION.....	53
ANNEXE A	
PREUVE DE SOUMISSION DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉ	
AU CHAPITRE III	57
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Peupliers de l'espèce <i>Populus trichocarpa</i> (Torr. & Gray).....	2
1.2	Spores de <i>Melampsora larici-populina</i> sur une feuille de peuplier.....	3
1.3	Représentation d'une cellule végétale envahie par un haustorium.....	4
1.4	Modèle en zigzag illustrant les différentes phases de la réponse immunitaire végétale.....	5
1.5	Activation d'une protéine de résistance du type NB-LRR en présence d'un facteur d'avirulence.	7
1.6	Activation des voies de défense végétales par les protéines NB-LRR.	9
1.7	Lésions caractéristiques de la réaction hypersensible (HR) de mort cellulaire consécutive à l'inoculation de souches mutantes de la bactérie <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	11
2.1	Plant d' <i>Arabidopsis thaliana</i> (génotype Col-0) âgé de six semaines.	15
2.2	Représentation schématique du système de sécrétion de type III (T3SS) des bactéries phytopathogènes.....	15
2.3	Plant de <i>Nicotiana benthamiana</i> âgé de huit semaines.....	17
2.4	Transfert d'ADN de la cellule d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> à la cellule végétale.	17

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Avr	Protéine ou facteur d'avirulence
CC	Domaine superhélice des protéines R (« coiled coil »)
eGFP	Variant de la protéine fluorescente verte (« enhanced green fluorescent protein »)
ETI	Réaction de défense végétale déclenchée suite à la reconnaissance des Avr par les protéines R (« effector-triggered immunity »)
ETS	État de susceptibilité de la plante à l'invasion pathogène dû à la translocation d'effecteurs dans les cellules végétales (« effector-triggered susceptibility »)
HR	Réaction hypersensible (« hypersensitive response »)
kDa	Symbole du kilodalton
LRR	Domaine composé de motifs répétés riches en leucine, présent dans les protéines R (« leucine-rich repeat »)
MAMP	Motif moléculaire conservé chez un groupe de phytopathogènes microbiens (« microbe-associated molecular pattern »)
Mb	Méga (paires de) bases soit 10^6 (paires de) bases
<i>Mlp</i>	<i>Melampsora larici-populina</i>
<i>Mmd</i>	<i>Melampsora medusae</i> f. sp. <i>deltoidae</i> (Ici, f. sp. est l'abréviation de « forma specialis » et sert à désigner l'hôte auquel le parasite s'est adapté.)
MPT	Modification post-traductionnelle
NB	Domaine de liaison aux nucléotides présent dans les protéines R (« nucleotide-binding »)

Nup	Nucléoporine
PAMP	Motif moléculaire conservé chez un groupe de phytopathogènes (« pathogen-associated molecular pattern »)
PRR	Récepteur végétal à domaine extracellulaire reconnaissant un PAMP/MAMP (« pattern recognition receptor »)
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pathovar <i>tomato</i>
PTI	Réaction de défense végétale déclenchée par la reconnaissance des PAMP/MAMP par les PRR (« pathogen-triggered immunity »)
R	Protéine de résistance végétale
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (« reactive oxygen species »)
SP	Peptide signal (« signal peptide »)
SYTA	Synaptotagmine A
T-DNA	ADN de transfert (« transfer DNA »)
TIP49a	Abréviation de « 49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein »
TIR	Domaine récepteur toll/interleukine-1 des protéines R (« toll/interleukin-1 receptor »)
T3SS	Système de sécrétion de type III (« type III secretion system »)
ufc	Unité formant colonie
USDA	Ministère de l'agriculture américain (« United States Department of Agriculture »)

LISTE DES SYMBOLES

- Δ La lettre Δ (delta) est utilisée pour indiquer une troncature dans une protéine; par exemple, P Δ S est la protéine P privée du segment S.
- :
- Dans une expression du type pP:S, le deux-points indique que la séquence S est insérée dans le plasmide pP.
- ::
- Ce symbole désigne l'expression d'un transgène; ainsi L::G signifie que la lignée recombinante L exprime le transgène G.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

En 2006 étaient publiées les données de séquençage du génome du peuplier *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) (Figure 1.1). Cet arbre, le premier à faire l'objet d'un séquençage, avait été choisi comme arbre modèle en raison de la relative petite taille de son génome (environ 520 Mb) et parce qu'il se prêtait bien à la transformation génétique (Taylor, 2002; Tuskan *et al.*, 2004; Wulfschleger *et al.*, 2013). Caractérisé aussi par sa croissance rapide, pouvant atteindre trois mètres par an dans des conditions favorables (Stanturf *et al.*, 2001), le peuplier fait par ailleurs l'objet d'une exploitation commerciale. Son bois est utilisé comme matériau de construction, sa pulpe est transformée en papier et pourrait aussi bientôt servir de matière première pour la production de biocarburants (Davis, 2008; Sannigrahi *et al.*, 2010; Tuskan *et al.*, 2004). Le genre *Populus* comprend plus d'une trentaine d'espèces qui se répartissent sur tout l'hémisphère Nord et dont plusieurs sont largement distribuées sur le territoire canadien (Cooke et Rood, 2007; Sannigrahi *et al.*, 2010).



Figure 1.1 **Peupliers de l'espèce *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray).**
Crédit photographique : Dave Powell, USDA Forest Service, Bugwood.org.

L'exploitation économique du peuplier est toutefois compromise par plusieurs phytopathogènes, dont des champignons microscopiques du genre *Melampsora*, qui sévissent dans les peupleraies (Coyle *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2007; Stanturf *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2012). Parmi ceux-ci, *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) est un des agents de la maladie dite de rouille foliaire du peuplier (Hacquard *et al.*, 2011; Joly *et al.*, 2010). Cette maladie, qui se manifeste par la formation d'amas de spores de couleur orangée à la surface des feuilles infectées (Figure 1.2), peut provoquer une défoliation précoce entraînant le dépérissement des arbres infectés (Hacquard *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2007). *Mlp* est un organisme biotrophe qui ne peut survivre qu'aux dépens d'un hôte vivant auquel il soutire des nutriments (Caillaud *et al.*, 2012). Il envahit le tissu

végétal au moyen de prolongements cytoplasmiques, les haustoria, qui établissent des zones d'échange entre les cellules du parasite fongique et celles de son hôte végétal (Catanzariti *et al.*, 2007; Hacquard *et al.*, 2011) (Figure 1.3). À travers cette interface, le pathogène transfère un arsenal de protéines, appelées effecteurs, destinées à prendre le contrôle de la machinerie cellulaire végétale (Hacquard *et al.*, 2012). Selon des analyses *in silico*, plusieurs centaines d'effecteurs concourraient à la pathogénicité de *Mlp*, néanmoins la fonction *in planta* de ces protéines reste à élucider (Hacquard *et al.*, 2012). Parmi les effecteurs de *Mlp*, celui désigné 124202 possède une homologie de séquence avec la protéine AvrM de *M. lini*, le champignon responsable de la rouille du lin (Catanzariti *et al.*, 2006; Hacquard *et al.*, 2012). En dépit d'études poussées, la fonction de la protéine AvrM n'en demeure pas moins inconnue à ce jour (Ve *et al.*, 2013). Les connaissances sur 124202 sont quant à elles particulièrement restreintes. Ainsi, alors qu'une protéine reconnaissant AvrM a été trouvée dans le lin, la protéine M en l'occurrence (Catanzariti *et al.*, 2006), aucune molécule interagissant spécifiquement avec 124202 n'a encore été détectée dans le peuplier.



Figure 1.2 Spores de *Melampsora larici-populina* sur une feuille de peuplier.
Crédit photographique : Andrej Kunca, National Forest Centre - Slovakia, Bugwood.org.

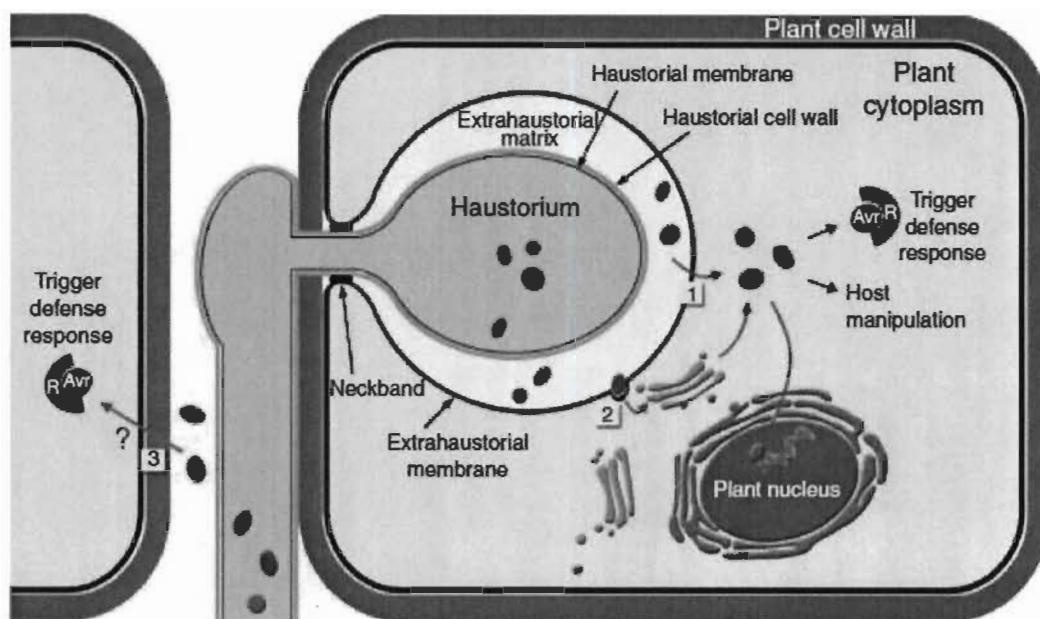


Figure 1.3 Représentation d'une cellule végétale envahie par un haustorium.
 Les effecteurs fongiques (représentés en rouge) peuvent cibler divers compartiments de la cellule végétale. Lorsqu'ils sont reconnus par une protéine de résistance végétale (R), ils prennent le nom de protéine d'avirulence (Avr).
 Source : Catanzariti *et al.* (2007, p. 182)

Pour parvenir à coloniser son hôte, *Mlp* doit déjouer plusieurs mécanismes de défense des plantes (Jones et Dangl, 2006; Spoel et Dong, 2012). Les cellules végétales possèdent des récepteurs de surface dits « pattern recognition receptors » (PRR) pouvant reconnaître des signatures moléculaires conservées chez les phytopathogènes, les « pathogen-associated molecular patterns » (PAMP). La flagelline (une protéine constitutive du flagelle bactérien) et la chitine (un glucide présent dans la paroi fongique) sont des exemples typiques de PAMP (Dou et Zhou, 2012). La détection de PAMP par les PRR active une réponse immunitaire végétale, relativement peu spécifique et peu intense, la « pathogen triggered-immunity » (PTI; Figure 1.4 : phase 1). La PTI entraîne un influx d'ions Ca^{2+} dans les cellules végétales (en vue d'activer des kinases calcium-dépendantes), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'activation de cascades de signalisation par des protéines kinases, la

transcription de gènes de défense, la libération de composés antimicrobiens et le renforcement de la paroi végétale (Dou et Zhou, 2012).

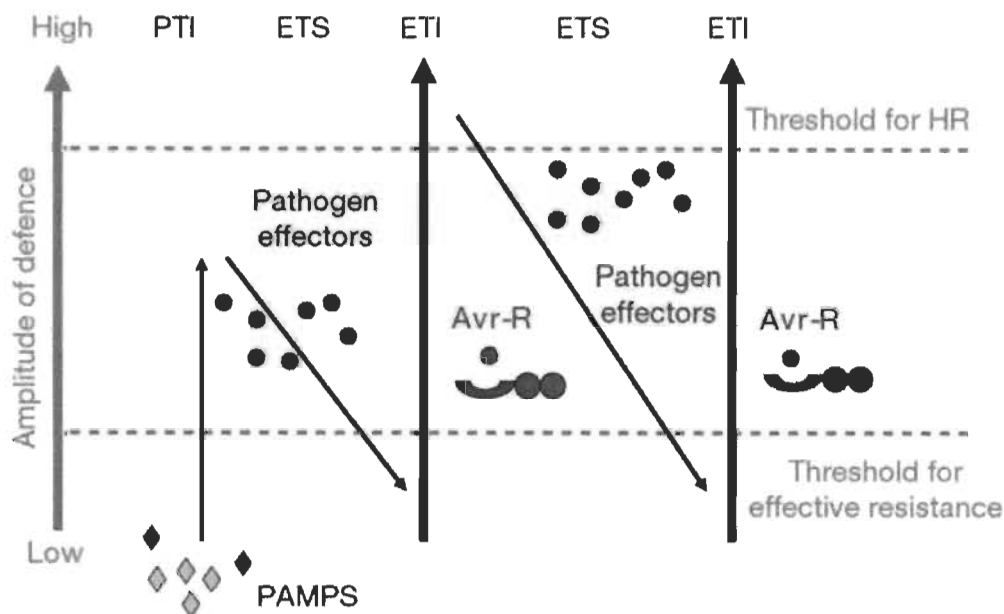


Figure 1.4 Modèle en zigzag illustrant les différentes phases de la réponse immunitaire végétale.

Phase 1 : Des « pathogen-associated molecular patterns » (PAMP, losanges rouges) sont détectés par des « pattern recognition receptors » (PRR) des plantes, ce qui déclenche la « PAMP-triggered immunity » (PTI).

Phase 2 : Des effecteurs parviennent à s'introduire dans des cellules hôtes favorisant ainsi la nutrition et la propagation du pathogène. La PTI fait place à la « effector-triggered susceptibility » (ETS).

Phase 3 : La reconnaissance d'un effecteur (Avr, petit rond rouge) par une protéine de résistance végétale (R) déclenche une réponse immunitaire plus forte que la PTI, la « effector-triggered immunity » (ETI). Si l'intensité de cette réponse excède un certain seuil, la réaction hypersensible (HR) de mort cellulaire peut se produire.

Phase 4 : La pression de sélection favorise les effecteurs (petits ronds bleus) capables d'échapper à la détection par les protéines R et donc d'éviter le déclenchement de la ETI. Les protéines R s'adaptent jusqu'à reconnaître ces effecteurs et le cycle de coévolution plante-pathogène se perpétue.

Source : Jones et Dangl (2006, p. 323)

Certains pathogènes ne sont néanmoins pas arrêtés par cette première ligne de défense et parviennent à transférer des effecteurs à l'intérieur des cellules cibles. Aussi longtemps que ces effecteurs ne sont pas reconnus comme non-soi par les cellules végétales, la plante demeure vulnérable à l'envahissement par le pathogène; cet état est appelé « effector-triggered susceptibility » (ETS; Figure 1.4 : phase 2).

La reconnaissance d'un effecteur, par une protéine R végétale, cause le déploiement d'une seconde réponse de défense de la plante, plus spécifique et plus intense que la PTI, la « effector-triggered immunity » (ETI; Figure 1.4 : phase 3). Dans ce contexte, les effecteurs reconnus par les protéines R sont appelés facteurs d'avirulence (Avr).

La plupart des protéines R connues appartiennent au groupe des NB-LRR : elles ont une structure commune comportant un domaine N-terminal, un domaine central de liaison aux nucléotides (« nucleotide-binding », NB) et un domaine C-terminal formé par la répétition de motifs riches en leucine (« leucine-rich repeat », LRR; Elmore *et al.*, 2011; Marone *et al.*, 2013). La région N-terminale se décline en domaine « récepteur toll/interleukine-1 » ou TIR (« toll/interleukin-1 receptor ») et domaine superhélice ou CC (« coiled coil »; Bonardi et Dangl, 2012; Elmore *et al.*, 2011; Marone *et al.*, 2013). La région N-terminale (TIR ou CC) confère une spécificité d'interaction avec d'autres protéines végétales, la région centrale (NB) peut catalyser l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (activité ATPase), la région C-terminale (LRR) est celle qui est impliquée dans la reconnaissance des Avr (Bonardi et Dangl, 2012; Elmore *et al.*, 2011; Marone *et al.*, 2013) (Figure 1.5).

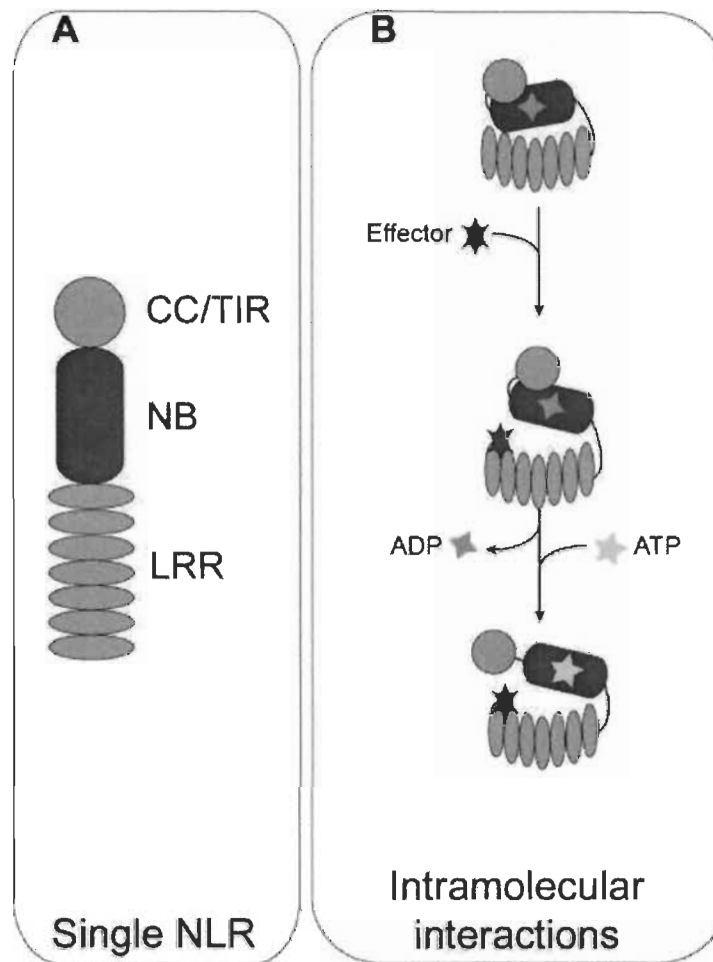


Figure 1.5 Activation d'une protéine de résistance du type NB-LRR en présence d'un facteur d'avirulence.

(A) Les trois modules (TIR/CC, NB, LRR) de la protéine de résistance.
 (B) La fixation d'un effecteur à l'extrémité LRR de la protéine entraîne un premier changement de conformation qui expose le domaine NB. L'hydrolyse d'ATP au site NB entraîne un second changement de conformation qui expose le domaine TIR/CC.

Source : Bonardi et Dangl (2012, p. 2)

La ETI (déclenchée par l'interaction R-Avr) consiste en une reprogrammation transcriptionnelle des cellules hôtes (Figure 1.6) (Caplan *et al.*, 2008) et peut culminer avec la réponse hypersensible (« hypersensitive response », HR) caractérisée par la mort cellulaire rapide des cellules végétales localisées au site d'entrée du pathogène (Figure 1.4 : phase 3) (Mur *et al.*, 2008). La HR prévient ainsi l'utilisation des ressources nutritives végétales par l'agent infectieux. Sur les tissus végétaux infectés, cette réaction se manifeste par l'apparition de lésions (déshydratation et décoloration) circonscrites (Mur *et al.*, 2008) (Figure 1.7).

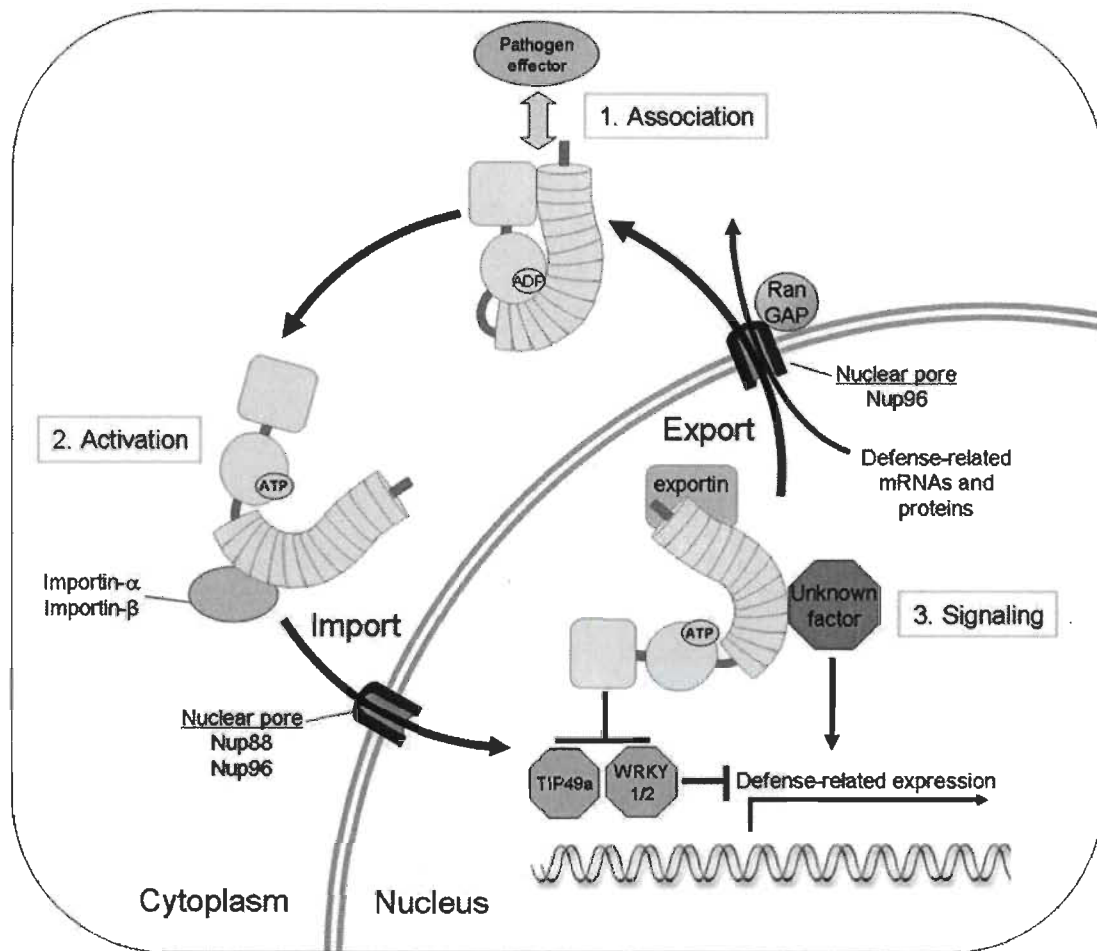


Figure 1.6 Activation des voies de défense végétales par les protéines NB-LRR.
 L'activation de la réponse de défense végétale se déroule selon trois étapes :

Étape 1 (association) : Dans le cytoplasme de la cellule végétale, l'effecteur (en rose) est reconnu par la protéine NB-LRR ou protéine R (en vert). (Il existe aussi un mécanisme de reconnaissance indirecte de l'effecteur, selon lequel la protéine NB-LRR interagit non pas avec l'effecteur mais avec une autre protéine végétale, non NB-LRR, elle-même modifiée par l'effecteur.)

Étape 2 (activation) : Suite à la reconnaissance de l'effecteur, la protéine R est activée par changement de conformation.

Étape 3 (signalisation) : La protéine R activée entre dans le noyau et modifie l'activité transcriptionnelle de manière à stimuler les voies de signalisation impliquées dans la défense de la cellule végétale.

L'activation de la réponse immunitaire peut résulter de l'inhibition de régulateurs négatifs de l'immunité tels que les facteurs de transcription WRKY ou le cofacteur de transcription TIP49a (en mauve). Il se peut aussi qu'un facteur de transcription encore non identifié (en violet) se lie aux protéines NB-LRR pour stimuler l'expression de gènes de défense.

Les pools nucléaire et cytosolique de protéines NB-LRR sont vraisemblablement entretenus par la machinerie de transport nucléocytoplasmique. Le franchissement du pore nucléaire (en bleu foncé) par les protéines NB-LRR dotées d'un signal de localisation nucléaire classique fait intervenir les importines α et β pour l'import, et les exportines pour l'export (en bleu clair). Nup88 et Nup96 sont des composants du pore nucléaire ayant un rôle important dans l'immunité innée de la cellule végétale; Nup96 pourrait notamment intervenir dans l'export de protéines ou d'ARN messagers particuliers impliqués dans la défense cellulaire. La protéine RanGAP2 (Ran GTPase-activating protein 2) pourrait, quant à elle, intervenir dans l'export de protéines NB-LRR ou d'autres protéines impliquées dans l'immunité, lors du transport nucléocytoplasmique.

À l'état de repos, les protéines NB-LRR inactives peuvent se trouver dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule végétale. L'activation par des effecteurs pathogènes entraîne l'accumulation des NB-LRR dans le noyau et la stimulation des voies de défense végétales.

Source : Caplan *et al.* (2008, p. 128)

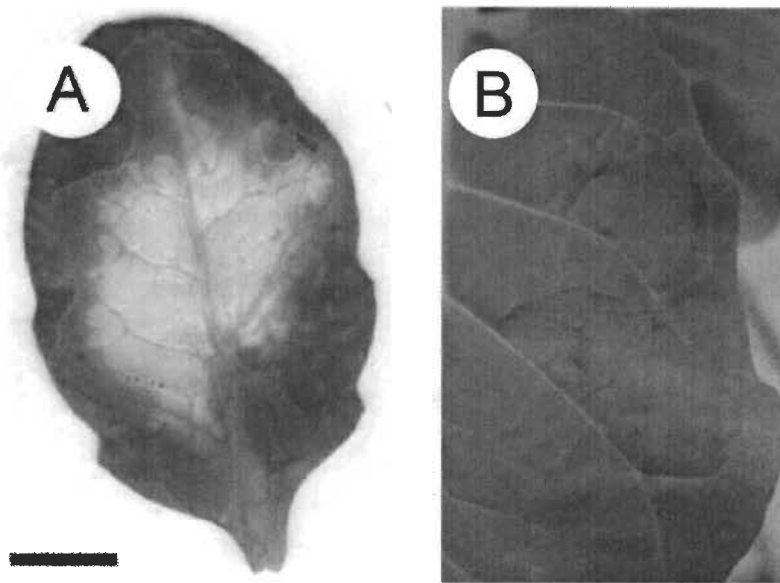


Figure 1.7 Lésions caractéristiques de la réaction hypersensible (HR) de mort cellulaire consécutive à l'inoculation de souches mutantes de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

(A) Feuille d'*Arabidopsis thaliana* 24 h après infiltration avec une suspension bactérienne contenant 1×10^6 ufc·mL⁻¹; barre d'échelle : 1 cm.

Source : Mur *et al.* (2008, p. 503)

(B) Symptômes de HR sur une feuille de *Nicotiana benthamiana* 16 h après infiltration avec une suspension bactérienne à la concentration de 2×10^6 ufc·mL⁻¹.

Source : Lee *et al.* (2013, p. 3)

Sous l'effet de la pression de sélection, les protéines Avr et R évoluent continuellement, les uns pour échapper à la détection des protéines R et les autres pour reconnaître spécifiquement les Avr (Figure 1.4 : phase 4).

Cette coévolution permanente est vraisemblablement à l'origine du polymorphisme constaté chez les facteurs Avr d'une part, et les protéines R d'autre part. Ainsi, chez *M. lini*, le locus *AvrM* abrite en fait cinq variants de séquence de l'allèle d'avirulence *AvrM* (*AvrM*-A, -B, -C, -D et -E), ainsi qu'un allèle de virulence, noté *avrM* (Catanzariti *et al.*, 2006). Les formes avirulentes de l'effecteur, c'est-à-dire les *AvrM* (à l'exception toutefois d'*AvrM*-E qui est une protéine tronquée) sont détectées par la protéine de résistance M du lin (*Linum usitatissimum*), la plante hôte de *M. lini*, et cette

reconnaissance peut déclencher une HR chez cette plante. À l'inverse, la forme virulente de l'effecteur (avrM) n'est pas détectée par l'hôte (Catanzariti *et al.*, 2007 et 2010).

Par ailleurs, chez le lin, le « locus *M* » est complexe et contient des gènes de résistance autres que *M* proprement dit (Anderson *et al.*, 1997; Lawrence *et al.*, 2010). Seule une forme de la protéine de résistance *M* du lin (une protéine du type TIR-NB-LRR) capable de reconnaître les AvrM est néanmoins connue (Anderson *et al.*, 1997; Catanzariti *et al.*, 2007).

Chez *Mlp*, 124202 fait partie d'une famille de huit gènes codant des protéines homologues, toutefois seuls deux de ces gènes semblent être transcrits, 124202 et 124209 (Hacquard *et al.*, 2012). Comme évoqué plus haut, le champignon *M. lini* exprime quant à lui six variants de séquence d'AvrM (Catanzariti *et al.*, 2006). Cette diversification pourrait résulter d'une forte pression évolutive visant à perpétuer une fonction déterminante pour la virulence de *Melampsora*.

L'identification des causes moléculaires de la sensibilité du peuplier à l'infection par *Mlp* permettrait de rationaliser le travail de sélection d'espèces de peupliers plus résistantes à la rouille foliaire. Nous avons donc entrepris d'étudier la fonction *in planta* de 124202 avec pour objectif d'identifier des protéines végétales susceptibles d'interagir avec cet effecteur.

En bref, nos résultats expérimentaux suggèrent que 124202 aurait pour sites d'action des compartiments membranaires et, en particulier, la membrane plasmique de la cellule végétale. Il semble en outre que cet effecteur présumé puisse échapper à la détection par les mécanismes de défense des cellules hôtes, ce qui suggère qu'il pourrait être impliqué dans le détournement des nutriments végétaux au profit de *Mlp*. Des travaux supplémentaires sont toutefois nécessaires afin de préciser les cibles moléculaires et le rôle biologique de 124202.

Une description de la méthodologie mise en œuvre pour mener à bien notre étude fait suite à la présente introduction. Après cela, les travaux réalisés sont présentés sous la forme d'un article scientifique. Ce mémoire est clos par une synthèse de nos principaux résultats et des suggestions concernant la poursuite des travaux exposés ici.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

Afin d'étudier spécifiquement la fonction de la protéine 124202 *in planta*, nous avons eu recours au pathosystème modèle : *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pour nous affranchir des contraintes liées à l'utilisation du pathosystème naturel peuplier-*Mlp*. En effet, contrairement au peuplier, la petite plante modèle *A. thaliana* (Figure 2.1) nécessite peu d'espace et de moyens pour être cultivée; de plus, comme le cycle de vie de ce végétal est de quelques semaines seulement, il est possible de travailler sur plusieurs générations de plantes successives. En raison de sa biotrophie, *Mlp* ne peut pas être cultivé *in vitro* sur des substrats nutritifs, ce qui limite les possibilités d'expérimentation; en outre, ce champignon ne présente pas de virulence vis-à-vis d'*A. thaliana*, au contraire de la bactérie *Pst* DC3000. Cette dernière possède un système de sécrétion de type III (T3SS) au moyen duquel elle transfère des effecteurs dans les cellules des plantes qu'elle infecte (Buttner et He, 2009) (Figure 2.2).

Pour comprendre la fonction de la protéine 124202 dans les plantes, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

1. Quel est le « degré de parenté » entre 124202 et ses homologues (en particulier, entre 124202 et les protéines AvrM et AvrM-A de *M. lini*, qui ont déjà fait l'objet de plusieurs études; Catanzariti *et al.*, 2006 et 2010; Rafiqi *et al.*, 2010; Ve *et al.*, 2013)?
2. Avec quelles protéines végétales 124202 est-elle susceptible d'interagir?
3. Quels sont les compartiments ciblés par 124202 dans les cellules hôtes?
4. Quel phénotype 124202 confère-t-elle aux plantes? En particulier, 124202 peut-elle altérer la résistance/susceptibilité des plantes aux pathogènes?



Figure 2.1 Plant d'*Arabidopsis thaliana* (génotype Col-0) âgé de six semaines.
Barre d'échelle : 2 cm.

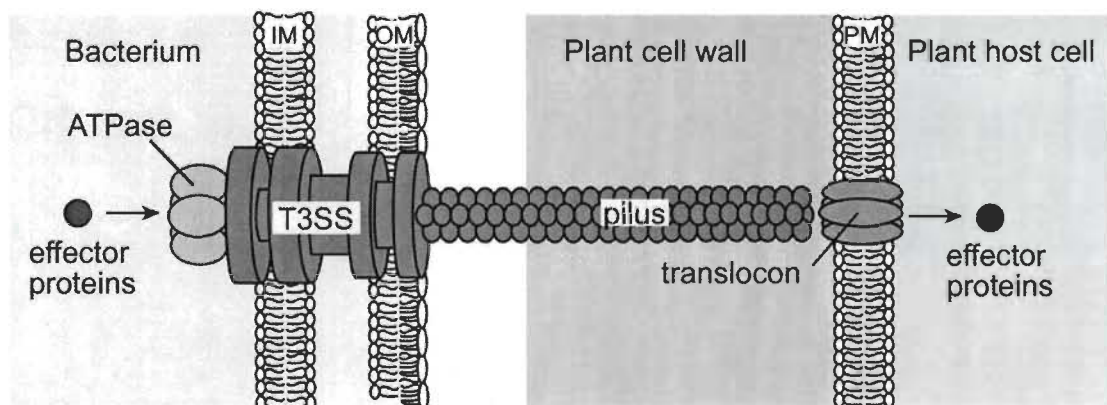


Figure 2.2 Représentation schématique du système de sécrétion de type III (T3SS) des bactéries phytopathogènes.
Source : Buttner et He (2009, p. 1657)

Pour apporter des éléments de réponse aux questions posées précédemment, nous avons procédé selon les étapes décrites ci-après.

Nous avons d'abord effectué une étude *in silico* basée sur l'analyse des séquences en acides aminés de 124202 et de ses homologues. En particulier, sachant que les effecteurs font souvent l'objet d'une sélection positive (Aguileta *et al.*, 2009; Hacquard *et al.*, 2012), nous avons élaboré un arbre phylogénétique des protéines 12420x et AvrM afin d'estimer les distances évolutives séparant ces différents homologues.

Par la suite, nous avons entrepris d'exprimer la protéine 124202 dans des plantes. Pour tester la fonctionnalité des constructions plasmidiques qui avaient été préparées pour nous, nous avons d'abord eu recours à l'expression transitoire du transgène d'intérêt dans *Nicotiana benthamiana* (Figure 2.3), une espèce de tabac se prêtant bien à ce type d'expérience (Nakasugi *et al.*, 2013). Nous avons ensuite généré des lignées d'*A. thaliana* transgéniques exprimant l'effecteur candidat 124202 de manière constitutive afin de pouvoir sélectionner des descendants homozygotes pour le transgène. Ce dernier codait une protéine de fusion (notée eGFP-124202ΔSP) associant une protéine fluorescente verte (eGFP) à l'extrémité N-terminale de l'effecteur fongique, lui-même tronqué d'un peptide signal présumé (124202ΔSP). En effet, la séquence du peptide signal est hautement conservée chez les protéines 12420x d'une part et AvrM d'autre part, mais aussi entre ces deux familles de protéines (Ve *et al.*, 2013). En exprimant transitoirement l'effecteur AvrM-A dans des feuilles de lin, Catanzariti *et al.* (2006) ont montré que le peptide signal d'AvrM-A entraînait la translocation de cet effecteur vers l'espace intercellulaire du tissu végétal (d'où l'effecteur était susceptible de réintégrer le cytoplasme des cellules hôtes). Ce résultat suggère que le peptide signal des protéines AvrM et 12420x est nécessaire à l'acheminement de ces protéines hors des cellules fongiques mais n'affecte pas la localisation de ces mêmes protéines dans les cellules végétales. Comme d'autres (Rafiqi *et al.*, 2010; Upadhyaya *et al.*, 2014), nous avons donc trouvé judicieux de ne pas inclure, dans le transgène, la séquence codant le peptide signal de l'effecteur. Pour créer des plantes transgéniques, la capacité naturelle

de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* à intégrer de l'ADN exogène dans des génomes végétaux a été utilisée (Gelvin, 2012; Valentine, 2003) (Figure 2.4).

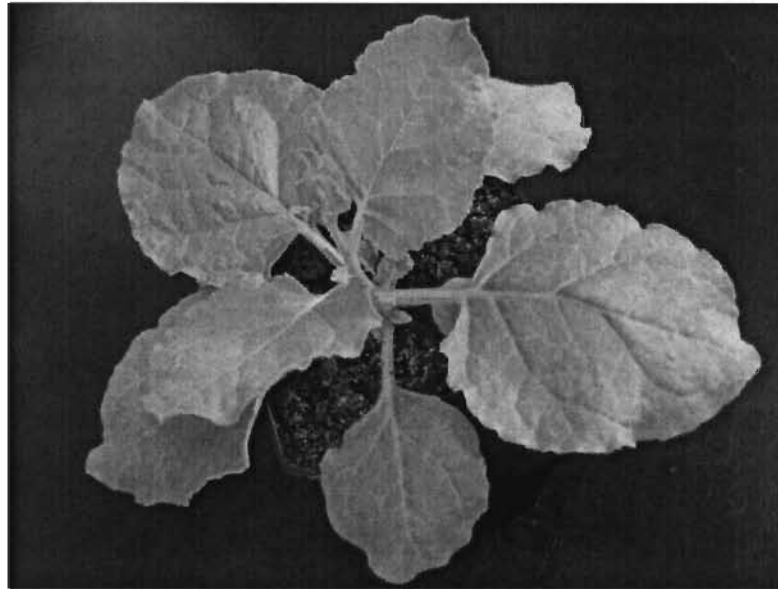


Figure 2.3 Plant de *Nicotiana benthamiana* âgé de huit semaines.

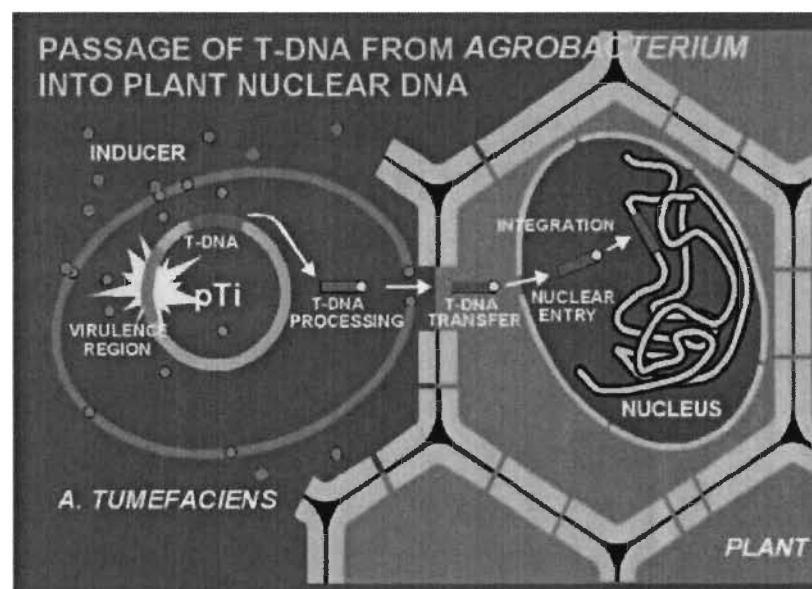


Figure 2.4 Transfert d'ADN de la cellule d'*Agrobacterium tumefaciens* à la cellule végétale.

T-DNA : ADN de transfert (« transfer DNA »).

Source : Rossi *et al.* (1998, p. 303-320)

Sachant que le génotype de départ de la plante peut influencer le comportement de cette plante après intégration du transgène au génome, nous avons choisi les génotypes à transformer en fonction des résultats de criblage double-hybride en levure ayant détecté des interactants potentiels de 124202 dans *A. thaliana*. Selon ces résultats de criblage (qui avaient été obtenus préalablement à nos travaux), 124202 serait susceptible d'interagir avec les trois protéines d'*A. thaliana* suivantes: lipoxigénase 2 (LOX2), synaptotagmine A (SYTA) et quinolinate synthase (OLD5). A priori, la résultante d'une telle interaction peut être : (i) une modification de la fonction de l'interactant, (ii) une action indirecte sur une autre protéine à laquelle l'interactant peut se lier, (iii) une inactivation de l'interactant. C'est cette troisième éventualité que nous avons choisi de tester ici sachant que, si elle se vérifiait, les plantes affectées développeraient un phénotype caractéristique (ce qui faciliterait l'interprétation de nos résultats expérimentaux). Posant donc l'hypothèse que 124202 aurait pour fonction d'inactiver LOX2, SYTA ou OLD5, nous avons entrepris de créer des lignées d'*A. thaliana* transgéniques exprimant l'effecteur d'intérêt en vue de comparer le phénotype de ces lignées aux phénotypes de plantes mutantes chez lesquelles le gène *LOX2*, *SYTA* ou *OLD5* avait été inactivé. Ces trois mutants étaient disponibles dans des banques de mutants. Cependant, chacun d'eux avait été généré dans un fonds génétique distinct (Col-0, *gll* ou *Ler*). Nous avons donc à notre tour, créé des lignées d'*A. thaliana* exprimant 124202 dans chacun de ces trois fonds génétiques.

Il convient ici d'ouvrir une parenthèse pour signaler qu'aucun des trois interactants potentiels de 124202 identifiés chez *A. thaliana* (à savoir LOX2, SYTA et OLD5) n'a été retrouvé lors du criblage double-hybride d'une banque d'ADNc de feuilles de peuplier infectées par *Melampsora medusae* f. sp. *deltoideae* (*Mmd*), en utilisant 124202 comme appât (voir Tableau S1 en page 45). LOX2, SYTA et OLD5 ont bien des homologues chez le peuplier (voir la section « Identification of potential 124202-interacting proteins » en page 27), toutefois ces interactants ont été identifiés suite au criblage d'une banque d'ADNc générée à partir de feuilles d'*A. thaliana* saines (voir la section « Yeast two-hybrid assay » en page 42) or un effet possible de l'infection par *Mmd* pourrait être de réduire les taux intracellulaires de LOX2, SYTA et OLD5. Il est

aussi concevable que l'arsenal d'effecteurs de *Mlp* et celui de *Mmd* soient suffisamment différents pour activer des réponses transcriptionnelles distinctes chez leur hôte commun. Comparé au sécrétome de *Mlp*, celui de *Mmd* est encore peu connu (Feau *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007) et si 124202 n'a pas de véritable homologue chez *Mmd*, une banque d'ADNc créée à partir de feuilles de peupliers infectées par *Mmd* ne peut pas rendre compte de l'effet de cet effecteur sur les cellules de peuplier. Par ailleurs, pour générer la banque d'ADNc en question, seuls des échantillons de feuilles prélevés 5 et 10 jours après l'inoculation avec *Mmd* ont été utilisés (voir la section « Yeast two-hybrid assay » en page 42); or il est vraisemblable que la réponse transcriptionnelle des cellules hôtes évolue tout au long du cycle infectieux.

Après avoir obtenu des plantes exprimant de manière constitutive la protéine d'intérêt marquée avec une étiquette eGFP, nous avons effectué des observations au microscope à fluorescence afin d'identifier les compartiments de la cellule végétale ciblés par cette protéine.

Au cours de la dernière étape de notre travail, nous avons tenté de déterminer si 124202 pouvait altérer la résistance des plantes à l'infection pathogène. Pour ce faire, nous avons quantifié la croissance de la bactérie *Pst* DC3000 dans des plants d'*A. thaliana*, en absence et en présence de 124202. Concernant les tests en présence de l'effecteur présumé, les deux approches suivantes ont été tentées : exprimer 124202 dans des cellules de *Pst* DC3000 recombinantes susceptibles de transférer ensuite cette protéine dans les cellules végétales (*via* le T3SS), ou bien utiliser des plantes transgéniques produisant elles-mêmes 124202 de manière constitutive. Dans le premier cas, des plantes non transgéniques ont été infectées avec soit *Pst* DC3000 soit *Pst* DC3000::124202 afin de comparer les vitesses de croissance de ces deux souches *in planta*. Dans le second cas, des plantes non transgéniques et des plantes transgéniques exprimant 124202 ont été infectées avec *Pst* DC3000 en vue de comparer les vitesses de croissance de cette souche dans chacun des deux génotypes végétaux. Il est utile d'insister ici sur le fait que deux voies différentes sont envisagées pour exposer les cellules végétales à 124202 : une voie exogène (faisant intervenir *Pst* DC3000 pour

produire l'effecteur et le transférer dans les cellules hôtes) et une voie endogène (impliquant la sécrétion de 124202 par les cellules végétales elles-mêmes). La finalité de cette démarche est de déterminer si la réponse de la plante est influencée par la façon dont celle-ci est exposée à l'effecteur.

CHAPITRE III

L'EFFECTEUR CANDIDAT 124202 DE *MELAMPSORA LARICI-POPULINA* INTERAGIT AVEC LES MEMBRANES

Ouassila Gaouar, Marie-Josée Morency, Armand Séguin, Hugo Germain

Le manuscrit d'article contenu dans ce chapitre a été soumis pour publication à la revue *PLOS ONE* (cf. Annexe A).

3.1 Contribution des auteurs

Ouassila Gaouar a réalisé les expériences, à l'exception du criblage double hybride en levure qui a été réalisé par Hugo Germain. L'article a été rédigé par Ouassila Gaouar et relu et commenté par Hugo Germain. Hugo Germain et Marie-Josée Morency ont réalisé les constructions plasmidiques. Armand Séguin a financé la bourse d'études de Ouassila Gaouar durant l'année 2013. Hugo Germain a financé le travail de recherche et a, par ailleurs, financé les études de Ouassila Gaouar durant une période de dix mois.

3.2 Résumé en français

Melampsora larici-populina (*Mlp*) est un champignon parasite agent de la rouille foliaire du peuplier, une maladie qui menace les plantations de peupliers à travers le monde. Comme d'autres phytopathogènes, *Mlp* injecte des protéines spécialisées, les effecteurs, dans les tissus et cellules de son hôte afin de s'en approprier les ressources. 124202 est un effecteur hypothétique identifié lors d'une analyse *in silico* du sécrétome de *Mlp*. Il présente 30 % d'identité de séquence avec l'effecteur AvrM de *M. lini*. La présente étude visait à caractériser le rôle biologique de 124202 dans les cellules hôtes. Des

criblages double-hybride dans la levure ont permis d'identifier trois interactants potentiels de 124202 dans les plantes : la lipoxygénase 2, la synaptotagmine A et la quinolinate synthase. Lorsqu'elle est exprimée de façon stable dans *Arabidopsis thaliana*, la protéine 124202, marquée avec un fluorophore, s'associe aux membranes et peut aussi être retrouvée dans le cytoplasme des cellules hôtes. Des tests d'infection de plants d'*Arabidopsis* sauvages et de plants transgéniques exprimant 124202 ont montré que 124202 n'altérerait pas la susceptibilité d'*Arabidopsis* à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Globalement, nos résultats suggèrent que la fonction de 124202 ferait intervenir un transport vésiculaire mais qu'elle ne contribue probablement pas de manière quantifiable à la suppression de l'immunité végétale.

3.3 Article scientifique

The 124202 candidate effector of *Melampsora larici-populina* interacts with membranes

Ouassila Gaouar¹, Marie-Josée Morency², Armand Séguin², Hugo Germain^{1*}

1 Département de chimie, biochimie et physique, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, **2** Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Laurentides, Québec, Québec, Canada

* Corresponding author:

hugo.germain@uqtr.ca

1-819-376-5011 extension 3357

Abstract

Melampsora larici-populina (*Mlp*) is a parasitic fungus causing poplar leaf rust, a disease that threatens poplar plantations worldwide. Like other phytopathogens, *Mlp* injects specialized proteins, called effectors, into host tissues and cells to eventually divert host resources. 124202 is a hypothetical *Mlp* effector selected through an *in silico* secretome analysis. It shares about 30% sequence identity with the *M. lini* AvrM effector. The objective of this work was to gain insight into the biological role of 124202 in host cells. Yeast two-hybrid screens identified three potential 124202 interactors in plants: lipoxygenase 2, synaptotagmin A, and quinolinate synthase. Stable expression of a fluorescently tagged 124202 protein in *Arabidopsis thaliana* showed that 124202 binds to membranes and may also be found in the cytoplasm of host cells. Bacterial infection assays, in wild type and 124202-expressing *Arabidopsis* lines, indicate that 124202 does not alter the susceptibility of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Overall, our results suggest that the function of 124202 might involve vesicle-mediated trafficking but is unlikely to quantifiably contribute to the suppression of plant immunity.

Introduction

Melampsora larici-populina (*Mlp*) belongs to the rust fungi group, the largest group of phytopathogens, with an estimated 7,800 species [1]. *Mlp* is the causative agent of poplar leaf rust, a disease endangering commercial poplar plantations worldwide [2-4]. Poplars have long been valued as timber trees and they are now being engineered to be used as biofuel feedstock [5-7]. *Mlp* is an obligate biotrophic parasite feeding on its host through cellular extensions, known as haustoria, that increase the exchange surface between the fungal and plant plasma membranes [2,8]. At this pathogen-host interface, *Mlp* releases a large number of proteins, called effectors, some of which remain in the space between the fungal and plant cells, while others are internalized into the host cells, via an unknown mechanism [9,10]. Phytopathogen effectors in general interfere with plant cell defenses and metabolism in order to make the host's nutrients available for the

invading pathogen [11]; identifying the specific functions of individual effectors has, however, proved extremely challenging. With many rust fungi being crop pathogens, considerable work is underway to understand how rust effectors promote parasitic fitness [12-14].

After the completion of the *Mlp* genome sequence [15], *in silico* secretome analyses revealed amino acid sequence homology between *Mlp*'s set of hypothetical 12420x proteins and the AvrM effectors from the flax rust *M. lini* [9]. The AvrM proteins were discovered about ten years ago [16], however, despite in-depth studies, their role in pathogenesis remains unknown [17]. The 12420x proteins are the predicted products of an eight-member gene family [9]. Based on the presence of highly conserved signal and uptake sequences in both the AvrM and the 12420x sets of proteins, Ve *et al.* (2013) suggested that the 12420x candidate effectors were likely to be internalized into host cells during infection [17]. At the same time, because of notable sequence dissimilarities among the 12420x homologs, it was hypothesized that these proteins may target distinct, albeit related, plant components [17]. Transcripts of *124202* and its relative, *124209*, have been found on the haustorial side of *Mlp* infected poplar leaves [9]. With a length of 413 amino acids, 124202 is the smallest of the 12420x proteins. It has a high lysine content (15% of total amino acids) and a theoretical isoelectric point of 9.34.

Here, we report the findings of *in silico* analyses, yeast two-hybrid (Y2H) screens, and *in planta* functional assays aimed at understanding how 124202 could contribute to the pathogenesis of poplar leaf rust disease. Using stable *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) transformants expressing the 124202 effector tagged with enhanced green fluorescent protein (eGFP), we investigated the biological effect and subcellular localization of 124202 *in planta*, and we also conducted bacterial infection assays. Our results suggest possible functional differences between 124202 and the AvrM proteins.

Results

Sequence relationships among the 12420x and AvrM proteins

A phylogenetic tree was constructed to assess the relationships among the members of the 12420x and AvrM families (Figure 1). Although no evolutionary path can be inferred from this tree, the branching pattern and the fact that the AvrMs form a distinct clade support the hypothesis that the 12420x proteins and the AvrMs have arisen from a common ancestor following a speciation event. Relatedness appears notably lower among the 12420x proteins than among the AvrMs. Sequence divergence seems to have resulted in four pairs of 12420x paralogs. Uneven evolutionary rates, within and between these paralogous pairs, suggest that the 12420x proteins are unlikely to have redundant functions.

In parallel with sequence-based phylogeny, the amount of disorder in 124202 and AvrM-A was also estimated. 124202 was predicted to contain a long stretch of approximately 30 to 40 disordered residues in its N-terminal half (Figure S1).

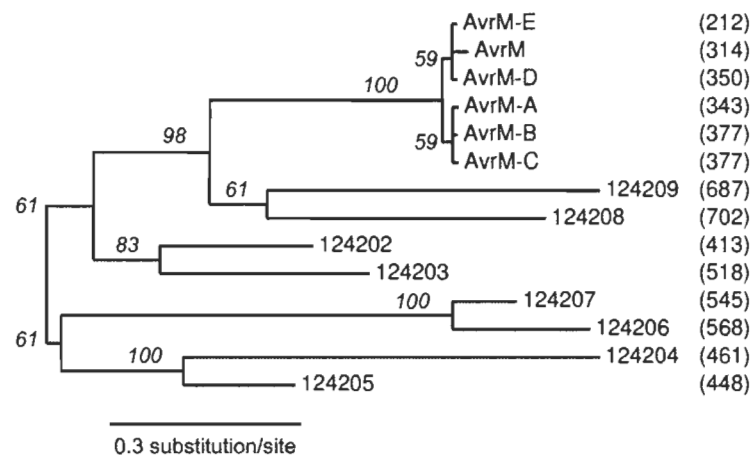


Figure 1. Bayesian phylogram of the 12420x and AvrM amino acid sequences. Branch support values are indicated next to the nodes (only values higher than 50% are shown). Protein lengths (numbers of amino acids) are indicated to the right of the tree (in blue). (See Materials and Methods for accession numbers.)

Identification of potential 124202-interacting proteins

The Y2H system was used to identify 124202 possible targets within host cells. Our screen of an *Arabidopsis* cDNA library using 124202 as bait revealed 7 candidate plant targets. Excluding superfamily members and proteins with poorly characterized functions, we restricted our functional investigation to the three following interactors: lipoxygenase 2, synaptotagmin A, and quinolinate synthase (Table 1). Each of these three proteins has a counterpart in poplar, the natural host of *Mlp* (the NCBI protein accession numbers of those poplar homologs being respectively: XP_002314229.2, XP_002312964.1, and XP_002322206.2).

Based on the assumption that the host target protein is inactivated upon interaction with 124202, our approach for determining the biological relevance of our Y2H results was to generate transgenic *Arabidopsis* lines expressing 124202 and observe whether their phenotype matched that of an *Arabidopsis* line harboring a loss-of-function mutation in the *LOX2*, *SYTA* or *OLD5* gene (Table 1).

However, because each of these three loss-of-function mutants was available in a distinct genetic background (Table 1) we generated *Arabidopsis*::124202 transformants in the Columbia-0 (Col-0), *glabra1* (*gll*), and Landsberg *erecta* (*Ler*) backgrounds.

Table 1

Potential 124202 interactors in *Arabidopsis*, as identified through yeast two-hybrid screening

Protein/gene name (locus)	Hits	Localization (function)	Loss-of-function mutant/background	References
Lipoxygenase 2/ <i>LOX2</i> (At3g45140)	13	Chloroplast, cytoplasm (growth and development, senescence, pest and pathogen resistance, response to wounding)	<i>lox2</i> (knockdown)/ <i>gll</i>	[69]
Synaptotagmin A/ <i>SYTA</i> (At2g20990)	3	Plasma membrane, endosome membrane (maintenance of plasma membrane integrity during freezing and osmotic stresses)	<i>syta</i> (dominant- negative T-DNA mutant)/ Col-0	[40]
Quinolate synthase/ <i>OLD5</i> (At5g50210)	1	Chloroplast (NAD ⁺ biosynthesis)	<i>old5</i> (point mutation decreasing the Cys desulfurase activity required for quinolate synthase activity)/ <i>Ler</i>	[70]

Transient expression of recombinant 124202 in *Nicotiana benthamiana*

For stable *in planta* expression of 124202, a construct encoding the enhanced green fluorescent protein (eGFP) fused to the N-terminus of the 124202 protein (lacking a predicted 25-amino-acid signal peptide, 124202ΔSP) was created (Figure 2A). When this construct was tested in *Agrobacterium*-mediated transient expression assays in *Nicotiana benthamiana* (using the RNA silencing suppressor protein p19 [18]), the recombinant eGFP-124202ΔSP protein produced a major 73 kDa band and a faint 70 kDa band on immunoblots (Figure 2B). No symptoms were observed on tobacco

leaves 6 days after agroinfiltration with the *eGFP-124202 Δ SP* and *p19* constructs (*i.e.* after transgene expression had reached its peak; Figure 2C).

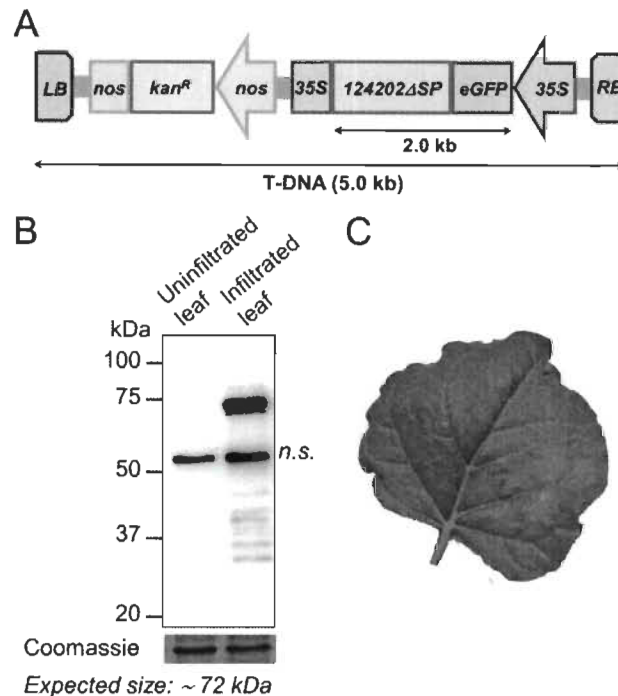


Figure 2. N-terminally eGFP-tagged 124202 can be expressed in *N. benthamiana* cells.

Schematic representation of the T-DNA construct used for *in planta* expression of recombinant 124202 (RB/LB, right and left T-DNA border, respectively). The *eGFP-124202* construct is flanked by the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and terminator. The neomycin phosphotransferase selectable marker (*kan^R*) is flanked by the nopaline synthase (*nos*) promoter and terminator. (B) *eGFP-124202 Δ SP* is detected as two bands on immunoblots. Leaves of ten-week-old *N. benthamiana* plants were infiltrated ($OD_{600} = 0.8$) with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 cells carrying vectors for the expression of *eGFP-124202 Δ SP* and the RNA silencing suppressor *p19*. Leaf samples were collected, 6 days after agroinfiltration, for Western blot analysis with an anti-GFP antibody (*n.s.*: non-specific bands). Coomassie blue-stained RuBisCO large subunit was used as a loading control. (C) Absence of symptoms on a tobacco leaf co-expressing *eGFP-124202 Δ SP* and *p19*, 6 days after agroinfiltration (the infiltrated leaf half is marked).

Analysis of *Arabidopsis* transformants

Transgenic *Arabidopsis* lines carrying the *eGFP-124202ΔSP* construct were generated by agrotransformation. Lines carrying only a single T-DNA copy were selected based on their segregation ratio on kanamycin-containing medium. However, even though the *eGFP-124202ΔSP* gene was present in all selected lines (Figure 3A), on immunoblots its protein product was only detectable in a *Ler* transformant and resolved as a doublet of approximately 70 and 73 kDa (Figure 3B). A faint band at about 23 kDa could also be seen (Figure 3B). Expression of *eGFP-124202ΔSP* did not confer any distinct phenotype to transgenic *Ler* plants homozygous for *eGFP-124202ΔSP* (Figure 3C).

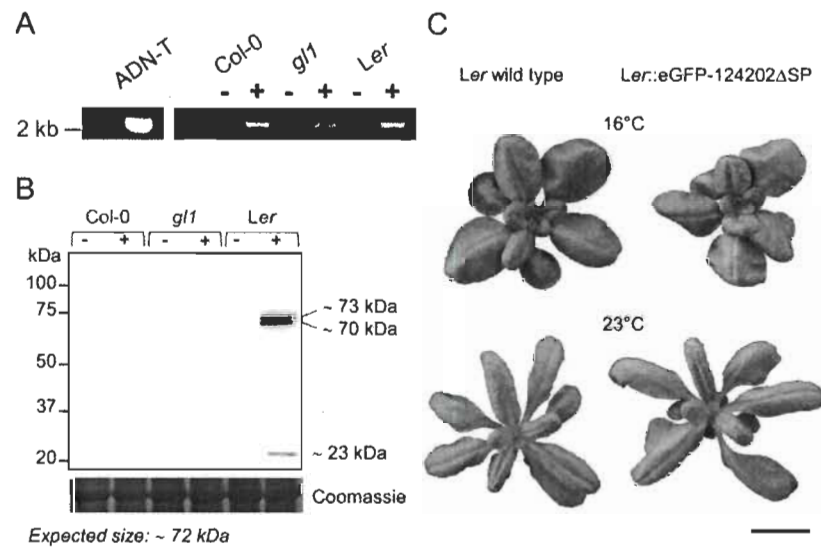


Figure 3. Representative results showing background-dependent expression of recombinant 124202 in *A. thaliana*.

(A) PCR genotyping of *A. thaliana* transformants harboring the *eGFP-124202ΔSP* construct (-/+; non transgenic/transgenic plant). The full-length coding sequence of eGFP-124202ΔSP (~ 2.0 kb) was amplified. (B) Immunodetection of eGFP-124202ΔSP in *A. thaliana* seedlings (-/+; non transgenic/transgenic plant). Proteins extracted from twelve-day-old plantlets grown on agar plates were analyzed by Western blot with an anti-GFP antibody. Coomassie blue-stained RuBisCO large subunit was used as a loading control. (C) Pictures of four-week-old non transgenic and homozygous transgenic *Ler* plants grown at either 16°C or 23°C. Scale bar: 1 cm.

Subcellular localization of 124202 in *Arabidopsis*

When expressed in a stable transgenic *Ler* line, eGFP-124202 Δ SP localized mainly to the plasma membrane and to the surface of vesicles (Figure 4). Some of these vesicles appeared to be squeezed between the tonoplast and the plasma membrane; weak cytoplasmic staining was also observed (Figure 4B). Cytosolic and vesicle labeling could also be detected in guard cells (Figure 4: B & C).

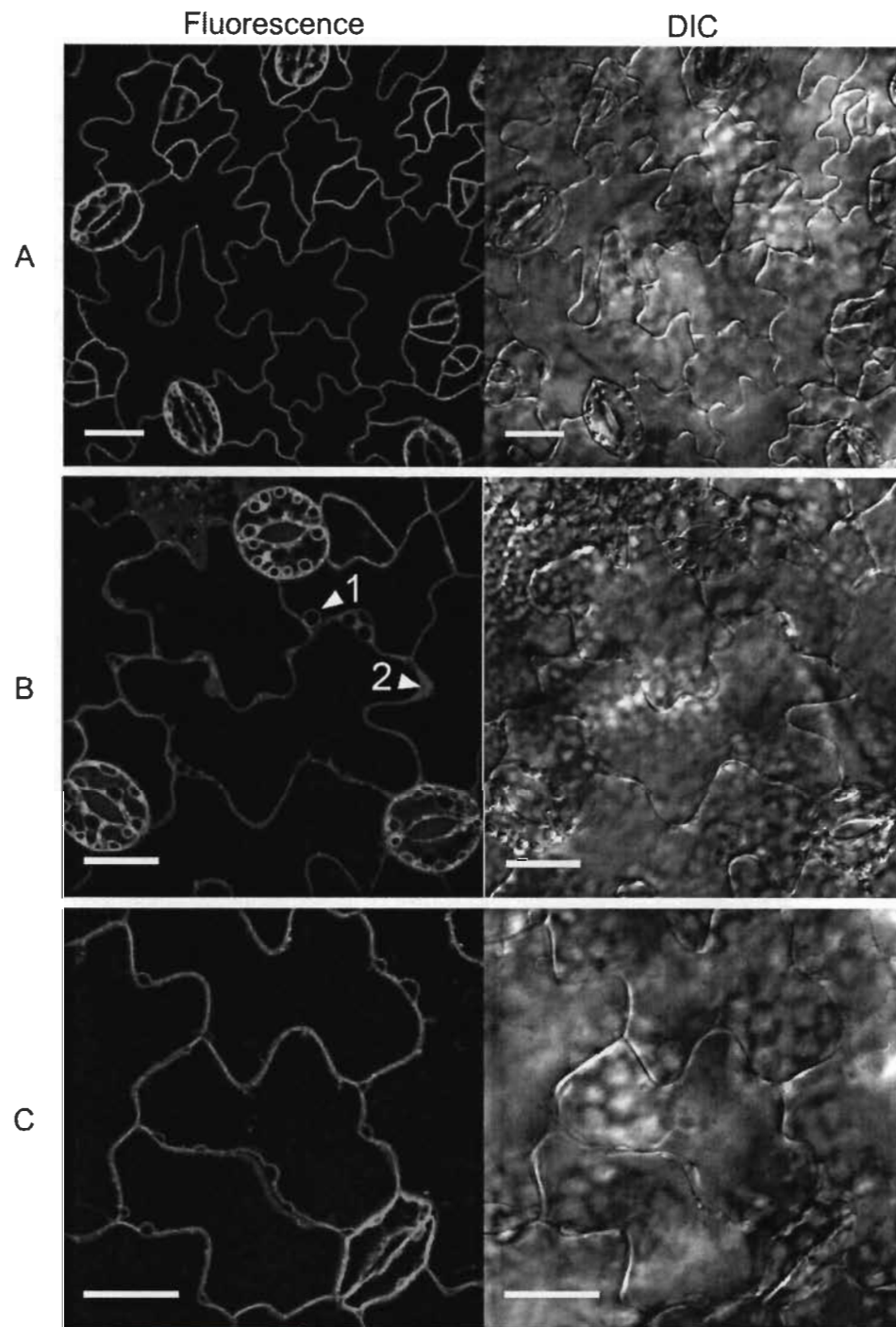


Figure 4. *eGFP-124202ΔSP* has an affinity for membrane compartments. Confocal images of live leaf epidermal cells of twelve-day-old transgenic *Ler* plantlets expressing *eGFP-124202ΔSP* under the control of the CaMV 35S promoter. Scale bar: 20 μ m. DIC: differential interference

contrast. (A) eGFP-124202 Δ SP localizes to the plasma membrane. (B) eGFP-124202 Δ SP is also found on the surface of vesicles (arrow 1) and in the cytoplasm (arrow 2). (C) Inward budding vesicles suggest that 124202 recycles to the cytosol.

Pst DC3000 infection of *A. thaliana*

In order to assess whether 124202 could potentiate the virulence of *Pseudomonas syringae* or mitigate the defense response of *A. thaliana*, we performed bacterial growth assays in *Arabidopsis*. To this end, a chimeric construct consisting of the *P. syringae* AvrRpm1 effector translocation signal and the Mlp 124202 effector, lacking its own signal sequence and tagged at the C-terminus with hemagglutinin (*AvrRpm1-T3SS-124202 Δ SP-HA*), was transformed into *P. syringae* DC3000 cells. Western blot analysis revealed that induction of *AvrRpm1-T3SS-124202 Δ SP-HA* expression in *Pst* DC3000 cells resulted in an amino-terminal truncated effector protein lacking approximately 145 amino acids (Figure 5A). *In vitro*, *Pst* DC3000 carrying the empty pVSPPsSP expression vector and *Pst* DC3000 transformed with pVSPPsSP:*AvrRpm1-T3SS-124202 Δ SP-HA* had comparable growth curves (Figure 5B). Bacterially expressed 124202 Δ SP-HA did not alter the response of Col-0 wild type plants to infection with *Pst* DC3000 (Figure 5C). Since this lack of effect could be caused by the protein truncation in the bacteria, we also compared bacterial growth (without effector) in *Ler* and *Ler* plants expressing the eGFP-tagged effector. We observed that *in planta* expression of eGFP-124202 Δ SP did not affect *Pst* DC3000 growth in *Ler* plants (Figure 5D).

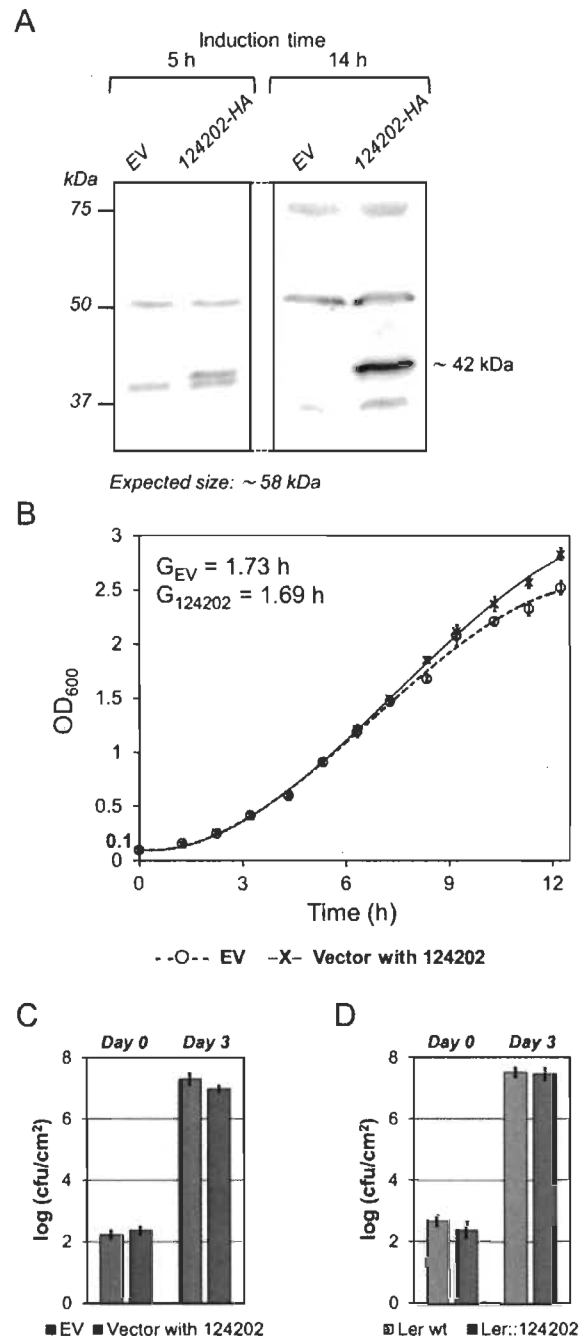


Figure 5. 124202 does not affect *Pst* DC3000 growth in Col-0 and *Ler* plants.

(A) Detection of 124202 Δ SP-HA expression in *Pst* DC3000 by immunoblotting. *Pst* DC3000 cells carrying either the empty vector (EV) or the 124202 Δ SP-HA construct with the leader sequence of AvrRpm1 at the N-terminus were grown in King's B medium and subsequently cultured in induction medium prior to protein extraction and analysis by

Western blotting. Immunodetection was performed using rabbit anti-HA antibody followed by HRP-conjugated anti-rabbit IgG. (B) *In vitro* growth of recombinant *Pst* DC3000. Each experimental point on the curves corresponds to the mean (\pm standard error) of OD₆₀₀ readings from three separate cultures (G: generation time). (C) and (D) Quantification of recombinant *Pst* DC3000 growth in *Arabidopsis*. Four-week-old wild type Col-0 (C) and five-week-old wild type/transgenic *Ler* plants (D) were syringe-infiltrated with *Pst* DC3000 (OD₆₀₀ = 0.0001) carrying the EV or the 124202 Δ SP-HA construct. Bacterial growth was measured three days post-inoculation (cfu: colony forming unit). For each set of conditions, the results from one representative experiment are given (similar results were obtained in three independent trials). Shown are the means and standard errors calculated from three biological replicates.

Discussion

The absence of genomic data on *Melampsora* species other than *Mlp* and *M. lini* makes it difficult to assess the level of evolutionary relatedness between the 12420x and the AvrM proteins. In addition, identification of true functional orthologs is complicated by the fact that there are several 12420x and AvrM paralogs, and also by the apparent divergence among the 12420x members. The AvrM proteins show only little diversity indicating that they may have evolved to escape recognition by host resistance (R) proteins whereas the divergence observed in the 12420x family could suggest a neofunctionalization of the initial ancestor. From a phylogenetic perspective, a comparison of the levels of intrinsic disorder in the 12420x and AvrM proteins may provide additional insight into the mutational patterns that positively affect pathogen fitness. Indeed, it is being increasingly recognized that disordered proteins evolve differently from ordered proteins [19,20]. Nevertheless, 124202 and AvrM seem to share some sequence-related properties. In our Y2H assays, 124202 was found to interact with itself (Table S1), which suggests that it may dimerize. Interestingly, the *M. lini* AvrM-A effector was shown to form dimers [17,21]. Dimerization is a frequent mechanism of protein activity regulation [22,23] and there are indications that self-interaction may double the number of binding partners of a protein [24]. Intrinsic disorder is another relevant factor involved in protein-protein interaction [25] and persistent disordered regions (DRs) within homodimers are thought to modulate the specificity of the

interactions between those dimers and their partners [26]. Furthermore, it has been proposed that the long (> 50 residues) DRs found in a number of bacterial effectors of phytopathogens may facilitate translocation, evasion of immune surveillance, and mimicry of host proteins [27]. DRs are also known to harbor various types of post-translational modification (PTM) sites [28,29]. PTMs might account for the doublet pattern observed in our Western blot analyses of plant-expressed 124202. Quite interestingly, immunoblots of recombinant AvrM-A–Cerulean fusion proteins also show a two-band pattern [17] and it is therefore tempting to speculate that 124202 and AvrM-A undergo modifications occurring at residues that are conserved in both proteins. Incidentally, cleavage of the fluorescent tag could be detected for both our eGFP-124202 Δ SP protein and AvrM-A–Cerulean fusions [21].

The question of why the *eGFP-124202 Δ SP* construct is differently expressed in the Col-0, *gll*, and *Ler* backgrounds is intriguing. Transgene silencing is not an uncommon phenomenon in *Arabidopsis* T-DNA transformants and may result from either transcriptional gene silencing (TGS, *i.e.* abolition of DNA transcription) or post-transcriptional gene silencing (PTGS, *i.e.* suppression of translation through mRNA degradation [30]). The CaMV 35S promoter is known to mediate TGS in *Arabidopsis* [31]; furthermore, an elegant model postulating that PTGS could be triggered by transgene transcript levels in excess of sequence-dependent thresholds has been proposed [30]. Neither of these models seems to account for genetic background dependence, though. As a reminder, *Ler* plants harbor a loss-of-function mutation in *ERECTA* (*ER*), a pleiotropic gene encoding a leucine-rich repeat–receptor like kinase (LRR-RLK [32,33]).

The membrane localization we observed for eGFP-124202 Δ SP seems consistent with the presence of Lys/Arg rich regions in the 124202 protein since such regions have been shown to promote association with negatively charged membrane phospholipids [17,34]. The dual localization (endomembranes and cytoplasm) observed for eGFP-124202 Δ SP differs somewhat from the cytoplasmic-only localization observed for AvrM-A–Cerulean upon transient expression in *N. tabacum* and flax cells [21]. Several

effectors, from both bacterial and eukaryotic phytopathogens, have been shown to localize to host cells' plasma membrane and/or subcellular membranes [35-37]. This comes as no surprise given the fact that a number of effector targets reside at the plasma membrane [38] and the benefits pathogens derive from exploiting host cells' membrane trafficking pathways [39]. Of the three potential 124202 interactors we identified by Y2H, only SYTA is known to localize to the plasma membrane and to endosomes [40-42], which makes this protein our most plausible target for 124202. However, because of the imperfect specificity of the Y2H test itself [43], it can be argued that any membrane-associated protein sharing sufficient structural features with SYTA might be considered a likely interactor of 124202. Synaptotagmins are found in animals and plants; they possess two well-conserved C-terminal calcium/phospholipid binding domains, C₂A and C₂B [44,45]. The C2 domain is one of the most common lipid binding domains [46]. In plants, several C2 domain-containing proteins are known to be involved in abiotic and/or biotic stress responses [47-49]. Two noteworthy examples, in the context of plant-pathogen interaction, are the BAP1 protein which was shown to negatively regulate defense responses and cell death in *Arabidopsis* [50,51], and the wheat TaERG3 protein which has been predicted to be involved in the defense response against stripe rust and in resistance to abiotic stress [52].

Pst DC3000 has been proven suitable for the delivery of several heterologous oomycete and fungal effectors into plant cells [53,54]. Translocation *via* the bacterial type 3 secretion system (T3SS) was ensured by appending each of these effectors to the N-terminal signal peptide of a *P. syringae* avirulence protein, for example the first 89 amino acids of the *P. syringae* pv. *maculicola* *AvrRpm1* protein [53]. Although this approach was found effective for expressing AvrM (using *P. fluorescens* as the bacterial strain [55]), when applied to AvrRpm1-T3SS-124202ΔSP-HA, it failed to produce the expected result since only a truncated form of the chimeric effector, probably lacking the AvrRpm1 leader peptide, could be detected in *Pst* DC3000 whole cell extracts. Assuming that this *in vitro* expression assay reflects the *in planta* situation, it is likely that the delivery of the truncated 124202ΔSP-HA effector into plant cells is impaired. On the basis of our results, 124202ΔSP-HA does not affect *Pst* DC3000 growth *in vitro*

and in wild type Col-0 plants; neither does eGFP-124202 Δ SP alter the susceptibility of *Ler* plants to *Pst* DC3000. In flax, avirulent isoforms of the *M. lini* AvrM effector trigger a defense response mediated by the M resistance protein [16]. No such response was, however, observed in *Arabidopsis* (Col-0 and *Ler* accessions) or *N. benthamiana* in the presence of 124202 Δ SP, which suggests that neither of these plants possesses a resistance protein capable of recognizing 124202.

Conclusion

The biological role of 124202, like that of AvrM, remains elusive. Our results suggest that 124202 might target a plant cell housekeeping process (*e.g.* maintenance of plasma membrane integrity or transport of nutrients) rather than a host defense mechanism. We therefore believe that proteomic and metabolomic profiling of wild type and 124202-expressing plants could offer clues to the host components affected by the *Mlp* candidate effector.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The following *Arabidopsis* accessions were used: Col-0, *glabra 1* (*gll-1*, Arabidopsis Biological Resource Center stock CS1644), and Landsberg *erecta* (*Ler*, donated by Dr Xin Li, University of British Columbia). *Arabidopsis* and *N. benthamiana* plants were grown in soil, in a growth chamber, at 23°C, 60% relative humidity (RH), and with a 14h/10h photoperiod (135 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). For phenotype characterization, wild type and transgenic *Ler* plants were also grown at 16°C, 60% RH, and under a 16 hours light:8 hours dark regime (144 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

In vitro culture of *Arabidopsis* was performed on half-strength Murashige and Skoog medium (1/2MS) containing 0.8% agar. For the selection of transgenic plants,

kanamycin (100 mg.L^{-1}) was added to the medium. Other culture conditions were as described above.

Generation of *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants

The sequence encoding 124202 Δ SP (124202 deprived of its N-terminal 25 amino acid residues, considered as a possible signal peptide) was inserted into the pK7WGF2 GATEWAY destination vector [56] to allow the expression of 124202 Δ SP with an enhanced green fluorescent protein (eGFP) tag at the N-terminus (eGFP-124202 Δ SP). The resulting fusion gene was placed between the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and terminator, upstream of a kanamycin resistance gene (*kan^R*), driven by the nopaline synthase (*nos*) promoter, for transgenic plant detection (Figure 2). The recombinant pK7WGF2 vector was transformed into competent *A. tumefaciens* C58C1 cells. The floral dip method [57] was used to transform six-week-old *Arabidopsis* plants (backgrounds Col-0, *gll*, and *Ler*). The composition of the dipping medium was as follows: recombinant *A. tumefaciens* cells ($\text{OD}_{600} \approx 0.6\text{-}1.0$); 5% (m/v) sucrose; 50 mM acetosyringone; 0.05% (v/v) Sylgard 309 (Norac Concepts [58]). Transformants were selected on 1/2MS medium supplemented with kanamycin (100 mg.L^{-1}). T2 lines that showed 3:1 (resistant/susceptible) kanamycin segregation were considered single-copy insertion lines and, among them, lines with a 100% resistant T3 progeny were considered homozygous for the T-DNA.

Transient expression in *N. benthamiana*

Competent *A. tumefaciens* AGL1 cells were cotransformed with the recombinant plasmids pK7WGF2:eGFP-124202 Δ SP and pBin61:p19, the pBin61 vector [59] carrying the coding sequence of the tomato bushy stunt virus (TBSV) p19 protein, a suppressor of RNA silencing in *N. benthamiana* [18,60]. Transient expression was performed according to Sparkes *et al.* (2006) [61]. Briefly, cotransformed AGL1 cells were grown overnight in yeast extract-peptone (YEP) medium supplemented with

spectinomycin and kanamycin (50 mg.L^{-1} each), at 28°C and 190 rpm. They were then washed and resuspended in infiltration medium to a final OD_{600} of 0.8 before being syringe-infiltrated into the leaves of ten-week-old *N. benthamiana* plants.

Plant genotyping

Leaves (about 80 mg fresh weight) from four-week-old *Arabidopsis* plants were harvested and snap-frozen on dry ice before being ground to powder using Qiagen's TissueLyser II. DNA was then extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). PCR amplification was performed with the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (M0530S, New England BioLabs). Primers annealing to the 35S promoter and terminator regions (see Figure 2A and Table S2) were chosen so as to amplify the full-length coding sequence of eGFP-124202 Δ SP. PCR products were run on a 1% (w/v) agarose gel containing 0.01% (v/v) SYBR Safe for DNA visualization.

Protein extraction and immunoblot assay

Ten-day-old *in vitro* grown *Arabidopsis* seedlings (35 mg) or three 6 mm *N. benthamiana* leaf discs were placed in 0.5 mL protein homogenization buffer (1 part 4X SDS-PAGE sample buffer and 3 parts protein extraction buffer: 0.1 M Tris-Cl, pH 8.0; 0.1 M SDS; 2% mercaptoethanol; 1X Pierce protease inhibitor, 88665, Thermo Scientific). Samples were ground using the Qiagen TissueLyser II (28 Hz, 1 min), heated at 75°C for 8 min, and centrifuged (13000 rpm, 5 min) before being subjected to 8% SDS-PAGE.

Proteins were then transferred to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore), and immunodetection was carried out using mouse monoclonal anti-GFP primary antibody (1:3000 dilution; CLH106AP, Cedarlane) and HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:5000 dilution; 170-5047, Bio-Rad).

Recombinant *Pseudomonas syringae* strain for the delivery of the 124202 effector into plant cells

A construct containing the 124202 Δ SP coding sequence with the AvrRpm1 secretion and translocation sequence at the N-terminus and a hemagglutinin (HA) tag at the C-terminus was cloned, under the control of the AvrRpm1 promoter, into the pVSPPsSPdes vector [53]. Construct integrity was confirmed by sequencing. *P. syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst* DC3000) cells were transformed with the pVSPPsSPdes vector, either empty or carrying the *AvrRpm1-T3SS-124202 Δ SP-HA* construct. Heterologous expression of AvrRpm1-T3SS-124202 Δ SP-HA in *Pst* DC3000 was induced as follows. Starter cultures of *Pst* DC3000 (carrying either the empty vector or the *AvrRpm1-T3SS-124202 Δ SP-HA* construct) were grown overnight at 28°C in KB medium containing 50 mg.L⁻¹ each of rifampicin and kanamycin. Flasks of fresh KB medium (with the appropriate antibiotics) were inoculated with the starter cultures and cells were grown to mid-log phase (OD₆₀₀ \approx 0.8) before being washed and cultured for the indicated times in an induction medium prepared as described by Kim *et al.* (2010) [62]. For Western blot detection of chimeric 124202, cells were next harvested by centrifugation and resuspended in water; bacteria from 1 mL of suspension at OD₆₀₀ = 2.0 were pelleted, resuspended in 100 μ L of 1X SDS-PAGE sample buffer, and boiled for 5 min. Protein blots were probed with rabbit polyclonal anti-HA primary antibody (1:3000 dilution; sc-805, Santa Cruz Biotechnology) and HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:5000 dilution; sc-2004, Santa Cruz Biotechnology).

Growth of *Pst* DC3000 *in vitro*

Pst DC3000 cells from overnight starter cultures were inoculated to a final OD₆₀₀ of 0.01 into 100 mL of fresh LB medium containing the appropriate antibiotics (for each *Pst* DC3000 strain, three starter cultures and three 100 mL cultures were prepared). Cells were incubated at 28°C and 190 rpm. Samples were taken at different times to assess bacterial growth by OD₆₀₀ measurements. Generation times (G) were calculated during

the exponential phase using the formula: $G = \ln 2(t_2 - t_1) / (\ln C_2 - \ln C_1)$, where C_1 and C_2 are bacterial concentrations (*i.e.* OD₆₀₀ values) at times t_1 and t_2 respectively.

Bacterial inoculation assay

Pst DC3000 cells (carrying either the EV or *AvrRpm1-T3SS-124202ΔSP-HA*) were grown overnight at 28°C in KB medium containing rifampicin and kanamycin (50 mg.L⁻¹ each). Cells were pelleted (3500g, 10 min, 4°C), diluted to OD₆₀₀ = 0.0001 (~ 7x10⁴ cfu.mL⁻¹) in 10mM MgCl₂, and syringe-infiltrated into the leaves of four to five-week-old plants. At day 0 and day 3, four 6 mm leaf discs were collected, ground in 0.5 mL 10 mM MgCl₂, and serial dilutions were plated on KB medium with appropriate antibiotics. Three biological replicates were performed. Bacterial colony forming units (cfu) were counted 36 h after incubation at 28°C.

Yeast two-hybrid assay

Yeast two-hybrid screens were performed with the Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 (BD Biosciences Clontech). An *Arabidopsis* cDNA library was made from rosette leaves of four-week-old plants (ecotype Col-0) grown at 23°C, under a 16 h light/8 h dark regime. A poplar library was made from hybrid poplar NM6 mature leaves infected with *Melampsora medusae f. sp. deltoideae* (*Mmd*), using leaf samples harvested at 5 and 10 days post-infection. Pooled tissue samples were ground in liquid nitrogen. RNAs were extracted using the Qiagen RNeasy Plant Mini Kit and reverse transcribed using Invitrogen's M-MLV Reverse Transcriptase. The resulting cDNA libraries were then amplified according to Clontech's procedure, cloned in the pGADT7 vector, and transformed into Y187 yeast cells. The *124202* sequence was cloned in the pGBKT7 vector and the resulting bait plasmid was transformed into AH109 yeast cells. Since no autoactivation by the bait construct was observed, culture media were not supplemented with 3-amino-1,2,4-triazole. In total, 3.2x10⁵ and 5.2x10⁵ interactions were screened for *Arabidopsis* and poplar, respectively. Diploid yeast cells (carrying pGBKT7 and

pGADT7) were first grown on medium stringency SD/-His/-Leu/-Trp growth medium. All positive colonies were then replicated onto high stringency SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal growth medium. Plasmids were extracted from all blue colonies, retransformed into *Escherichia coli*, isolated by miniprep, and sent for sequencing.

Laser scanning confocal microscopy

Arabidopsis plantlets grown in petri dishes were observed using either an Olympus FLUOVIEW FV1000 microscope. Excitation/emission wavelengths (in nm) of eGFP were 488/499-535. The ImageJ software [63] was used to annotate images.

Bioinformatic analyses

UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) accession numbers for the sequences of interest are the following: F4S6E2 (124202); F4S6E1 (124203); F4RW28 (124204); F4RW29 (124205); F4RGY5 (124206); F4R586 (124207); F4S8Q3 (124208); F4S8Q4 (124209); Q2MV46 (AvrM); Q2MV52 (AvrM-A); Q2MV51 (AvrM-B); Q2MV50 (AvrM-C); Q2MV45 (AvrM-D); Q2MV44 (AvrM-E).

The lysine content and theoretical isoelectric point of 124202 were computed using the ExPASy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Phylogenetic tree reconstruction

The amino acid sequences of interest were retrieved from the UniProtKB database and aligned with dialignTX (<http://dialign-tx.gobics.de/>) [64]. The phylogenetic tree was reconstructed by a bayesian method using the MrBayes program [65] available from the phylogeny.fr server (<http://www.phylogeny.fr/>) [66,67]. The number of substitution types was set to 6. The WAG matrix [68] was used as the amino acid replacement matrix. Substitution rates were estimated from the data assuming invariable sites and a

gamma distribution. Branch support values were obtained by running 100,000 generations, sampling every 100th generation, and using a burn-in value of 250.

Supplementary information

```

124202      1  MKPKSKSLKEIFLLWAIANVNFVCVKGHPSLPKDIIILAEVDKGVGTAPS
AvrM-A      1  MMISTKSKLENIFLLLAIANVNFVCVKGHPM---NSAKAEEKOGLNAA

124202     51  NGADGLKDERVAQDISQPIPDGKLETAALHHSQTGSR TKMEEVGN
AvrM-A     48  HDSLNNLGTVPDVPHOIPN-----DKSGTPEA---

124202    101  AVTKVEIGILKDLKTAKEESRAVKSKGVPNPEPNV-----VDGKK
AvrM-A     77  ---EDPKDMKGFNKALKSTEEKLGTSSEVGIPPEFDRGFLRPFCAKM

124202    146  KFLNVAQVQGLSDSDLIGYIAQKERELEKSKIEFLETTMDHKFEQKPFTE
AvrM-A    124  KFLKPDQVCKLSTDDLITYMAEKDKNVRDLAKLRDAKQDSTKNGTP---

124202    196  AGIQPSGAYFHNSVDSKDOYNQAYQKTLTEAKNLVSKESLTPEALSCLTN
AvrM-A    171  -----EIKQTYDKAYEKTAAAELVSEESLTRDALLKLTE

124202    246  KEYVKKASLFDQKVQONLAWEAQEDLMHDYLSKEFKLQALEF---KSQK
AvrM-A    207  EQYVEKAALFDKDVYRNNLKRQTYEKLRLSETDVLVREVARIFIAREGEP

124202    293  KIDAKWTAMEEVKEKAKETGETDPTSLEKAAQRQETKNOAKRHPKNLG
AvrM-A    257  ALTAKIERLALTENNADTRSKPIDYLAIAAD--FLKNOANLHADDPE

124202    343  WKEDDETKEFEKYVREAEKKALSAKRVLPRTDLLSAAKMKHLGKLF
AvrM-A    303  LNLYKAEKARETEANRAMKEALGADKLFKRNKILKPD-----

124202    393  INFFKNMFAWFSLGRKTSBK
AvrM-A

```

Figure S1. Pairwise sequence alignment of 124202 and AvrM-A showing predicted natively disordered regions.

The sequences were aligned using T-Coffee v6.85 (http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/one_task.cgi?task_type=tcffee) [71]. The residues were shaded using Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Black/grey shading indicates identical/similar residues, respectively. Intrinsically disordered regions were predicted with PreDisorder (<http://casp.rnet.missouri.edu/predisorder.html>) [72-74]. Residues with a disorder probability > 0.5 are colored red.

Table S1

Putative 124202 interactors in poplar,
identified using the yeast two-hybrid system

Protein name	NCBI reference sequence
hypothetical protein POPTR_0001s39950g (<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_006370128.1
hypothetical protein POPTR_0013s06780g (<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_006375957.1
GMFP7 family protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_002306185.1
polyubiquitin family protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_002317213.1
124202 (<i>Melampsora larici-populina</i>)	XP_007416945.1

Table S2

Primers used in this work

Binding site	Sequence (5'→3')	Use
35S promoter	TTCATTTGGAGAGGACTCCG	amplification of <i>eGFP-124202ΔSP</i>
35S terminator	ATGCTCAACACATGAGCGAA	

Acknowledgments

We thank Dr Xin Li for the donation of Landsberg *erecta* seeds and Dr Paul P. Dijkwel for kindly providing the *old5* mutant.

References

1. Helfer S (2014) Rust fungi and global change. *New Phytol* 201: 770-780.
2. Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N, et al. (2011) The poplar-poplar rust interaction: Insights from genomics and transcriptomics. *J Pathog* 2011: 716041.
3. Joly DL, Feau N, Tanguay P, Hamelin RC (2010) Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.). *BMC Genomics* 11: 422.
4. Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, et al. (2007) The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 816-831.
5. Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Tuskan GA (2010) Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuels, Bioprod Biorefin* 4: 209-226.
6. Taylor G (2002) *Populus*: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? *Ann Bot* 90: 681-689.
7. Wilkerson CG, Mansfield SD, Lu F, Withers S, Park J, et al. (2014) Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone. *Science* 344: 90-93.
8. Catanzariti A, Dodds PN, Ellis JG (2007) Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 269: 181-188.
9. Hacquard S, Joly DL, Lin Y, Tisserant E, Feau N, et al. (2012) A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol Plant Microbe Interact* 25: 279-293.
10. Petre B, Kamoun S (2014) How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biol* e1001801. doi:10.1371/journal.pbio.1001801.
11. Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DGO, Yoshida K, et al. (2012) Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77: 235-247.

12. Alfano JR (2009) Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Mol Plant Pathol* 10: 805-813.
13. Giraldo MC, Valent B (2013) Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat Rev Microbiol* 11: 800-814.
14. Koeck M, Hardham AR, Dodds PN (2011) The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell Microbiol* 13: 1849-1857.
15. Duplessis S, Cuomo CA, Lin Y, Aerts A, Tisserant E, et al. (2011) Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9166-9171.
16. Catanzariti A, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18: 243-256.
17. Ve T, Williams SJ, Catanzariti A, Rafiqi M, Rahman M, et al. (2013) Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17594-17599.
18. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956.
19. Brown CJ, Johnson AK, Dunker AK, Daughdrill GW (2011) Evolution and disorder. *Curr Opin Struct Biol* 21: 441-446.
20. Light S, Sagit R, Sachenkova O, Ekman D, Elofsson A (2013) Protein expansion is primarily due to indels in intrinsically disordered regions. *Mol Biol Evol* 30: 2645-2653.
21. Rafiqi M, Gan PHP, Ravensdale M, Lawrence GJ, Ellis JG, et al. (2010) Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* 22: 2017-2032.
22. Liu Z, Guo F, Zhang J, Wang J, Lu L, et al. (2013) Proteome-wide prediction of self-interacting proteins based on multiple properties. *Mol Cell Proteomics* 12: 1689-1700.
23. Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM (2004) The power of two: Protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci* 29: 618-625.

24. Ispolatov I, Yuryev A, Mazo I, Maslov S (2005) Binding properties and evolution of homodimers in protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res* 33: 3629-3635.
25. Dunker AK, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, et al. (2008) The unfoldomics decade: An update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 9 Suppl 2: S1.
26. Fong JH, Shoemaker BA, Garbuzynskiy SO, Lobanov MY, Galzitskaya OV, et al. (2009) Intrinsic disorder in protein interactions: Insights from a comprehensive structural analysis. *PLoS Comput Biol* 5: e1000316.
27. Marin M, Uversky VN, Ott T (2013) Intrinsic disorder in pathogen effectors: Protein flexibility as an evolutionary hallmark in a molecular arms race. *Plant Cell* 25: 3153-3157.
28. Gao J, Xu D (2012) Correlation between posttranslational modification and intrinsic disorder in protein. *Pac Symp Biocomput* : 94-103.
29. Kurotani A, Tokmakov AA, Kuroda Y, Fukami Y, Shinozaki K, et al. (2014) Correlations between predicted protein disorder and post-translational modifications in plants. *Bioinformatics* 30: 1095-1103.
30. Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, et al. (2004) Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: The predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* 16: 2561-2572.
31. Mlotshwa S, Pruss GJ, Gao Z, Mgutshini NL, Li J, et al. (2010) Transcriptional silencing induced by *Arabidopsis* T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *Plant J* 64: 699-704.
32. Terpstra IR, Snoek LB, Keurentjes JJB, Peeters AJM, van den Ackerveken G (2010) Regulatory network identification by genetical genomics: Signaling downstream of the *Arabidopsis* receptor-like kinase ERECTA. *Plant Physiol* 154: 1067-1078.
33. van Zanten M, Snoek LB, Proveniers MCG, Peeters AJM (2009) The many functions of ERECTA. *Trends Plant Sci* 14: 214-218.
34. Scheglmann D, Werner K, Eiselt G, Klinger R (2002) Role of paired basic residues of protein C-termini in phospholipid binding. *Protein Eng* 15: 521-528.

35. Badel JL, Piquerez SJM, Greenshields D, Rallapalli G, Fabro G, et al. (2013) In planta effector competition assays detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* effectors that contribute to virulence and localize to different plant subcellular compartments. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 745-757.
36. Hicks SW, Galan JE (2013) Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nat Rev Microbiol* 11: 316-326.
37. Thieme F, Szczesny R, Urban A, Kirchner O, Hause G, et al. (2007) New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1250-1261.
38. Bohm H, Albert I, Fan L, Reinhard A, Nurnberger T (2014) Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr Opin Plant Biol* 20C: 47-54.
39. Inada N, Ueda T (2014) Membrane trafficking pathways and their roles in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol* 55: 672-686.
40. Lewis JD, Lazarowitz SG (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2491-2496.
41. Schapire AL, Voigt B, Jasik J, Rosado A, Lopez-Cobollo R, et al. (2008) *Arabidopsis* synaptotagmin I is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *Plant Cell* 20: 3374-3388.
42. Yamazaki T, Takata N, Uemura M, Kawamura Y (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYT1, a type I signal-anchor protein, requires tandem C2 domains for delivery to the plasma membrane. *J Biol Chem* 285: 23165-23176.
43. Koegl M, Uetz P (2007) Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6: 302-312.
44. Craxton M (2004) Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* 5: 43.
45. Craxton M (2007) Evolutionary genomics of plant genes encoding N-terminal-TM-C2 domain proteins and the similar FAM62 genes and synaptotagmin genes of metazoans. *BMC Genomics* 8: 259.
46. Stahelin RV (2009) Lipid binding domains: More than simple lipid effectors. *J Lipid Res* 50 Suppl: S299-304.

47. de Silva K, Laska B, Brown C, Sederoff HW, Khodakovskaya M (2011) *Arabidopsis thaliana* calcium-dependent lipid-binding protein (AtCLB): A novel repressor of abiotic stress response. *J Exp Bot* 62: 2679-2689.
48. Kim Y, Kim S, Choi D, Ryu C, Park JM (2008) Molecular characterization of a pepper C2 domain-containing SRC2 protein implicated in resistance against host and non-host pathogens and abiotic stresses. *Planta* 227: 1169-1179.
49. Sakamoto M, Tomita R, Kobayashi K (2009) A protein containing an XYPPX repeat and a C2 domain is associated with virally induced hypersensitive cell death in plants. *FEBS Lett* 583: 2552-2556.
50. Yang H, Li Y, Hua J (2006) The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 48: 238-248.
51. Yang H, Yang S, Li Y, Hua J (2007) The *Arabidopsis* *BAP1* and *BAP2* genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol* 145: 135-146.
52. Zhang G, Sun YF, Li YM, Dong YL, Huang XL, et al. (2013) Characterization of a wheat C2 domain protein encoding gene regulated by stripe rust and abiotic stresses. *Biol Plantarum* 57: 701-710.
53. Rentel MC, Leonelli L, Dahlbeck D, Zhao B, Staskawicz BJ (2008) Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1091-1096.
54. Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JDG (2007) The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 4077-4090.
55. Upadhyaya NM, Mago R, Staskawicz BJ, Ayliffe MA, Ellis JG, et al. (2014) A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 27: 255-264.
56. Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.
57. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.

58. Mireault C, Paris LE, Germain H (2014) Enhancement of the *Arabidopsis* floral dip method with XIAMETER OFX-0309 as alternative to Silwet L-77 surfactant. Botany. dx.doi.org/10.1139/cjb-2014-0048.
59. Bendahmane A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe DC (2002) Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. Plant J 32: 195-204.
60. Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 14147-14152.
61. Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. Nat Protoc 1: 2019-2025.
62. Kim BJ, Schneider DJ, Cartinhour SW, Shuler ML (2010) Complex responses to culture conditions in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 continuous cultures: the role of iron in cell growth and virulence factor induction. Biotechnol Bioeng 105: 955-964.
63. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9: 671-675.
64. Subramanian AR, Kaufmann M, Morgenstern B (2008) DIALIGN-TX: Greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment. Algorithms Mol Biol 3: 6.
65. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754-755.
66. Chevenet F, Brun C, Banuls A, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinformatics 7: 439.
67. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, et al. (2008) Phylogeny.fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res 36: W465-9.
68. Whelan S, Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. Mol Biol Evol 18: 691-699.

69. Bell E, Mullet JE (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* 103: 1133-1137.
70. Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, et al. (2008) The *Arabidopsis onset of leaf death5* mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* 20: 2909-2925.
71. Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217.
72. Cheng J, Sweredoski M, Baldi P (2005) Accurate prediction of protein disordered regions by mining protein structure data. *Data Min Knowl Disc* 11: 213-222.
73. Deng X, Eickholt J, Cheng J (2009) PreDisorder: ab initio sequence-based prediction of protein disordered regions. *BMC Bioinformatics* 10: 436.
74. Hecker J, Yang JY, Cheng J (2008) Protein disorder prediction at multiple levels of sensitivity and specificity. *BMC Genomics* 9 Suppl 1: S9.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Découvrir la fonction d'une protéine requiert plusieurs approches complémentaires. Notre étude de l'effet *in planta* de la protéine fongique 124202 n'a certes pas livré d'explication définitive quant à la fonction de cet effecteur candidat, néanmoins elle a permis de poser des jalons pouvant orienter la suite des travaux de caractérisation de 124202. Nos principaux résultats peuvent être récapitulés ainsi :

1. La phylogénie moléculaire suggère que le gène codant la protéine 124202 évolue plus vite que les gènes codant les protéines AvrM (orthologues de 124202). Cela conforte l'hypothèse selon laquelle 124202 serait un effecteur de *Mlp*. En effet, une des caractéristiques des effecteurs est justement qu'ils subissent une pression de sélection positive afin d'échapper aux mécanismes de surveillance des cellules hôtes.
2. L'analyse par Western blot d'extraits protéiques issus de plantes exprimant la protéine de fusion eGFP-124202ΔSP indique que 124202 pourrait subir des modifications post-traductionnelles (MPT). L'immunodétection révèle en effet deux bandes là où seulement une bande est attendue, un aspect souvent associé à des MPT. Fait intéressant, un « dédoublement de bande » comparable a été observé pour AvrM-A, un homologue de 124202 chez *M. lini* (Ve *et al.*, 2013). Il est vrai que les deux bandes que nous détectons correspondent à des poids moléculaires apparents légèrement inférieurs au poids moléculaire attendu pour eGFP-124202ΔSP. Cependant, cet écart n'est pas nécessairement révélateur d'une dégradation de la protéine d'intérêt et pourrait être expliqué, par exemple, par le manque de précision des marqueurs de poids moléculaire ou par le fait que la composition particulière en acides aminés de la protéine

recombinante eGFP-124202 Δ SP pourrait affecter la vitesse de migration de cette protéine dans le gel de polyacrylamide - dodécylsulfate de sodium. (Cela étant dit, il est envisageable aussi que la protéine eGFP-124202 Δ SP subisse une maturation consistant en un clivage protéolytique au niveau de son extrémité C-terminale.)

3. Le phénotype de plants d'*A. thaliana* transgéniques exprimant constitutivement la protéine de fusion eGFP-124202 Δ SP, ne diffère pas du phénotype « sauvage ». La protéine 124202 ne produit donc apparemment pas d'effet délétère sur *A. thaliana*.
4. L'observation au microscope confocal indique que, dans la cellule végétale, eGFP-124202 Δ SP paraît avoir une affinité pour la membrane plasmique. Cet effecteur est aussi visible à la surface de vésicules et dans le cytoplasme ce qui suggère qu'il pourrait être recyclé de la membrane vers le cytoplasme.
5. Confrontées aux résultats d'un criblage double hybride dans la levure réalisé préalablement à notre travail, nos données de localisation cellulaire suggèrent que la synaptotagmine A (SYTA) végétale, ou peut-être une protéine ayant des caractéristiques structurales communes avec SYTA, pourrait interagir avec 124202. Une des particularités de SYTA est qu'elle possède deux domaines C2 de liaison aux ions Ca^{++} et aux lipides.
6. Des tests d'infection de plants d'*A. thaliana* « sauvages » et transgéniques (*Arabidopsis::eGFP-124202 Δ SP*) par la bactérie *Pst* DC3000, révèlent que l'expression *in planta* de 124202 n'altère pas la réponse d'*A. thaliana* à cette bactérie. Ce résultat suggère que 124202 ne module pas la réponse immunitaire végétale, ce qui n'exclut pas que cette protéine pourrait utiliser des mécanismes cellulaires clés des cellules hôtes, au profit de *Mlp*.

Afin de poursuivre la caractérisation de l'effecteur candidat 124202, il nous paraît judicieux de procéder aux expériences suivantes :

1. Utiliser une technique autre que le double hybride dans la levure afin de confirmer (ou d'infirmer) les résultats acquis avec ce test. La co-immunoprécipitation serait une alternative envisageable ici. Pour les interactants les plus plausibles, il serait intéressant de générer des transgéniques stables dans des plantes dont les fonds génétiques ne permettent pas l'expression des interactants présumés, afin d'étudier le devenir et l'effet de 124202 en l'absence de sa cible naturelle.
2. Utiliser la RT-PCR (« reverse transcriptase-polymerase chain reaction ») afin de déterminer si le gène *eGFP-124202ΔSP* est transcrit dans les lignées transgéniques chez lesquelles le produit de ce gène n'est pas détectable par Western blot. Cela permettrait de savoir si la répression de l'expression du transgène se produit au niveau transcriptionnel ou au niveau post-transcriptionnel.
3. Vérifier la localisation *in planta* de 124202 en ayant recours à une protéine de fusion dans laquelle la eGFP ne serait pas en position N-terminale mais plutôt en position C-terminale de 124202. En outre, la eGFP pourrait être remplacée par une autre protéine fluorescente en vue de détecter d'éventuels artefacts attribuables à l'étiquette fluorescente elle-même. En effet, dans la protéine *eGFP-124202ΔSP*, la taille de la eGFP (environ 27 kDa) représente plus du tiers de la taille de la protéine recombinante. La présence de l'étiquette eGFP affecte donc nécessairement la structure tridimensionnelle de la protéine d'intérêt et, par voie de conséquence, le comportement de cette protéine. Il est donc crucial de pouvoir confronter les résultats de localisation obtenus avec plusieurs étiquetages différents afin de déterminer l'effet de l'étiquette sur le devenir de la protéine de fusion, d'autant plus qu'ici la protéine d'intérêt, c'est à dire *124202ΔSP*, est elle-même exogène. En outre, afin d'étayer davantage

nos résultats de localisation cellulaire, il conviendrait de générer des plants d'*A. thaliana* (génotype *Ler*) transgéniques exprimant la eGFP seule afin d'observer la localisation cellulaire de cette protéine étiquette et l'influence de cette protéine sur le phénotype végétal. Par ailleurs, il y a lieu de noter que le niveau d'expression de la protéine recombinante peut, s'il est relativement élevé, causer une saturation de certaines voies de transport intracellulaires ce qui pourrait être interprété, à tort, comme une affinité de la protéine d'intérêt pour certains compartiments du système endomembranaire végétal (Moore et Murphy, 2009). En définitive, il faut garder présent à l'esprit que le comportement *in vivo* des protéines de fusion doit être interprété avec discernement et en regard des contrôles appropriés.

4. Tester l'effet *in planta* de 124209, l'autre transcrit de la famille 12420x retrouvé dans les haustoria de *Mlp* formés dans des cellules de peuplier infectées (Hacquard *et al.*, 2012). Pour cela, il faudrait créer des plantes transgéniques exprimant cet autre effecteur candidat (ou même 124202 et 124209 simultanément) et faire une étude similaire à celle décrite dans ce mémoire. Les protéines 124202 et 124209 étant homologues, une telle étude permettrait de détecter des motifs conservés importants pour leur activité. Il convient néanmoins de garder présent à l'esprit le fait que les effecteurs agissent vraisemblablement en synergie et que certains effets pourraient donc ne pas se manifester lorsqu'un effecteur est étudié isolément. Par ailleurs, il serait bon de tester la possibilité d'utiliser *Pst* DC3000 comme système de transfert de 124209 dans les cellules végétales. (Cette option s'est révélée peu probante dans le cas de 124202, car seule une protéine privée de la séquence supposée permettre la translocation de l'effecteur dans la cellule hôte était détectable.)
5. Modéliser la structure tridimensionnelle de 124202 et comparer cette structure à celles d'autres protéines dont les fonctions sont connues. Ceci pourrait permettre de découvrir des homologues structuraux de 124202 et d'obtenir des indices sur le mécanisme d'action de cet effecteur.

ANNEXE A

PREUVE DE SOUMISSION DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉ AU CHAPITRE III

From: **PLOS ONE** <no-reply@editorialmanager.com>
Date: 2014-07-17 11:30 GMT-04:00
Subject: Submission Confirmation for The 124202 candidate effector of *Melampsora larici-populina* interacts with membranes - [EMID:8590beebe67d12f4]
To: "Germain, Hugo" <Hugo.Germain@uqtr.ca>

PONE-D-14-32093
The 124202 candidate effector of *Melampsora larici-populina* interacts with membranes
PLOS ONE

Dear Dr. Germain,

Thank you for submitting your manuscript entitled "The 124202 candidate effector of *Melampsora larici-populina* interacts with membranes" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-14-32093.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguileta, G., Refregier, G., Yockteng, R., Fournier, E. et Giraud, T. (2009). Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(4), 656-670.
- Anderson, P.A., Lawrence, G.J., Morrish, B.C., Ayliffe, M.A., Finnegan, E.J. et Ellis, J.G. (1997). Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *The Plant Cell*, 9(4), 641-651.
- Bonardi, V. et Dangl, J.L. (2012). How complex are intracellular immune receptor signaling complexes? *Frontiers in Plant Science*, 3, 237.
- Buttner, D. et He, S.Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 150(4), 1656-1664.
- Caillaud, M., Wirthmueller, L., Fabro, G., Piquerez, S.J.M., Asai, S., Ishaque, N. et Jones, J.D.G. (2012). Mechanisms of nuclear suppression of host immunity by effectors from the *Arabidopsis* downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 285-293.
- Caplan, J., Padmanabhan, M. et Dinesh-Kumar, S.P. (2008). Plant NB-LRR immune receptors: From recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host & Microbe*, 3(3), 126-135.
- Catanzariti, A., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A. et Ellis, J.G. (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant Cell*, 18(1), 243-256.
- Catanzariti, A., Dodds, P.N. et Ellis, J.G. (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 269(2), 181-188.
- Catanzariti, A., Dodds, P.N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J.G. et Staskawicz, B.J. (2010). The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(1), 49-57.

- Cooke, J.E.K. et Rood, S.B. (2007). Trees of the people: The growing science of poplars in Canada and worldwide. *Canadian Journal of Botany*, 85(12), 1103-1110.
- Coyle, D.R., McMillin, J.D., Hall, R.B. et Hart, E.R. (2003). Effects of cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval defoliation, clone, and season on *Populus* foliar phagostimulants. *Environmental Entomology*, 32(3), 452-462.
- Davis, J.M. (2008). Genetic improvement of poplar (*Populus* spp.) as a bioenergy crop. In W. Vermerris (dir.), *Genetic improvement of bioenergy crops* (p. 377-396). New York, NY : Springer.
- Dou, D. et Zhou, J. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 484-495.
- Elmore, J.M., Lin, Z.D. et Coaker, G. (2011). Plant NB-LRR signaling: Upstreams and downstreams. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 365-371.
- Feau, N., Bergeron, M.-J., Joly, D.L., Roussel, F. et Hamelin, R.C. (2007). Detection and validation of EST-derived SNPs for poplar leaf rust *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1222-1228.
- Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N. et Duplessis, S. (2011). The poplar-poplar rust interaction: Insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens*, 2011, 716041.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legue, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouze, P., Martin, F., Hamelin, R.C. et Duplessis, S. (2012). A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(3), 279-293.
- Joly, D.L., Feau, N., Tanguay, P. et Hamelin, R.C. (2010). Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.). *BMC Genomics*, 11, 422.
- Jones, J.D.G. et Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Lawrence, G.J., Anderson, P.A., Dodds, P.N. et Ellis, J.G. (2010). Relationships between rust resistance genes at the *M* locus in flax. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 19-32.

- Lee, S., Yang, D.S., Uppalapati, S.R., Sumner, L.W. et Mysore, K.S. (2013). Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology*, 13(65), doi: 10.1186/1471-2229-13-65.
- Marone, D., Russo, M.A., Laido, G., De Leonardis, A.M. et Mastrangelo, A.M. (2013). Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7302-7326.
- Miranda, M., Ralph, S.G., Mellway, R., White, R., Heath, M.C., Bohlmann, J. et Constabel, C.P. (2007). The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 816-831.
- Moore, I. et Murphy, A. (2009). Validating the location of fluorescent protein fusions in the endomembrane system. *The Plant Cell*, 21(6), 1632-1636.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H. et Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 501-520.
- Nakasugi, K., Crowhurst, R.N., Bally, J., Wood, C.C., Hellens, R.P. et Waterhouse, P.M. (2013). *De novo* transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 8(3), e59534.
- Pacurar, D.I., Thordal-Christensen, H., Pacurar, M.L., Pamfil, D., Botez, C. et Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81.
- Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Ravensdale, M., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R. et Dodds, P.N. (2010). Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *The Plant Cell*, 22(6), 2017-2032.
- Rossi, L., Tinland, B. et Hohn, B. (1998). Role of virulence proteins of *Agrobacterium* in the plant. In H.J. Spaink, A. Kondorosi et P.J.J. Hooykaas (dir.), *The Rhizobiaceae* (p. 303-320). London : Kluwer Academic Publishers.
- Sannigrahi, P., Ragauskas, A.J. et Tuskan., G.A. (2010). Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(2), 209-226.

- Spoel, S.H. et Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews. Immunology*, 12(2), 89-100.
- Stanturf, J.A., van Oosten, C., Netzer, D.A., Coleman, M.D. et Portwood, C.J. (2001). Ecology and silviculture of poplar plantations. In D.I. Dickmann, J.G. Isebrands, J.E. Eckenwalder et J. Richardson (dir.), *Poplar Culture in North America* (p. 153-206). Ottawa : NRC Research Press, National Research Council of Canada.
- Taylor, G. (2002). *Populus*: Arabidopsis for forestry. do we need a model tree? *Annals of Botany*, 90(6), 681-689.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S.P. et Teichmann, T. (2004). Poplar genomics is getting popular: The impact of the poplar genome project on tree research. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 6(1), 2-4.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Dejardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y. et Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793), 1596-1604.
- Upadhyaya, N.M., Mago, R., Staskawicz, B.J., Ayliffe, M.A., Ellis, J.G. et Dodds, P.N. (2014). A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 255-264.
- Ve, T., Williams, S.J., Catanzariti, A., Rafiqi, M., Rahman, M., Ellis, J.G., Hardham, A.R., Jones, D.A., Anderson, P.A., Dodds, P.N. et Kobe, B. (2013). Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 17594-17599.

- Wulschleger, S.D., Weston, D.J., DiFazio, S.P. et Tuskan, G.A. (2013). Revisiting the sequencing of the first tree genome: *Populus trichocarpa*. *Tree Physiology*, 33(4), 357-364.
- Zhu, S., Cao, Y., Jiang, C., Tan, B., Wang, Z., Feng, S., Zhang, L., Su, X., Brejova, B., Vinar, T., Xu, M., Wang, M., Zhang, S., Huang, M., Wu, R. et Zhou, Y. (2012). Sequencing the genome of *Marssonina brunnea* reveals fungus-poplar co-evolution. *BMC Genomics*, 13, 382.